

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 11 May 2000 (11.05.00)	
International application No.: PCT/JP99/06111	Applicant's or agent's file reference: C2-006PCT
International filing date: 02 November 1999 (02.11.99)	Priority date: 04 November 1998 (04.11.98)
Applicant: SENOO, Chiaki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

02 November 1999 (02.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類7</b> C12N 9/64, 15/57, 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40, C12P 21/08, C12Q 1/37 // (C12P 21/02, C12R 1:91)	A1	<b>(11) 国際公開番号</b>  WO00/26352  <b>(43) 国際公開日</b>  2000年5月11日(11.05.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06111  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月2日(02.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/313366      1998年11月4日(04.11.98)      JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 妹尾千明(SENNO, Chiaki)[JP/JP] 沼田真理子(NUMATA, Mariko)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP) <b>(74) 代理人</b> 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: NOVEL TRYPSIN FAMILY SERINE PROTEASES</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ  <b>(57) Abstract</b> Two novel trypsin family serine proteases "Tespcc PRO-1" and "Tespcc PRO-2" which are expressed specifically in mature mouse testis and another novel trypsin family serine protease "Tespcc PRO-3" originating in mouse are isolated. Further, two novel trypsin family serine proteases "Tespcc PRO-2" and "Tespcc PRO-3" originating in humans are isolated. These proteins seemingly participate in the differentiation and maturation of sperm or sperm function (fertilization) and, therefore, are useful in developing novel remedies and diagnostics for sterility or in developing novel contraceptive drugs.		

成体マウス精巣に特異的に発現する2つの新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ(「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」)、ならびにマウス由来の新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ「Tespec PR0-3」を単離した。さらにヒト由来の2つの新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ(「Tespec PR0-2」及び「Tespec PR0-3」)を単離した。これらのタンパク質は、精子の分化・熟成または精子の機能(受精)に関与していることが示唆され、新しい不妊症の治療薬や不妊症診断薬の開発、あるいは新しい避妊薬の開発に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェッコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE グルジア  
GH ガーナ  
GM ガンビア  
GN ギニア・ビサウ  
GW ギニア  
GR ギリシャ  
HR クロアチア  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC セントルシア  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリ・ランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロヴェニア  
SK スロヴァキア  
SL シエラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TD チャード  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴィエトナム  
YU ユーゴスラビア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ



## 明細書

### 新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ

#### 技術分野

本発明は新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ、その遺伝子、並びにそれらの製造及び用途に関する。

#### 背景技術

雄性配偶子である精子は、雄の生殖器官である精巣において、主に（１）生殖幹細胞である精原細胞の自己増殖と精子への分化の開始、（２）精母細胞の減数分裂と遺伝子の組み換え、（３）半数体精子細胞の精子への形態形成、の３段階の過程を経て生産される。こうして形成された精子は交尾により雌体に排出され、卵管を通過し、雌性配偶子である卵子と結合し受精に至る（K. Yomogida および Y. Nishimune (1998) 蛋白質核酸酵素, 511-521）。

受精において、精子は卵管を通り卵子表面の透明帯と結合し、その透明帯を通過し、さらに卵子と融合する必要がある。これら受精の過程にはさまざまなプロテアーゼが関与している。例えば精子型アンジオテンシン変換酵素（testis ACE）は、そのノックアウトマウスの解析（J.H. Krege ら（1995）Nature 375, 146-148; C.R. Esther Jr ら（1996）Lab. Invest. 74, 953-965）から、精子が卵管を通る際に重要な役割を果たしていることが示されており（J.R. Hagaman ら, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2552-2557）、また、前駆体タンパク質変換酵素 4（PC4）も、雄のノックアウトマウスでは受精が著しく低下する（M. Mbikay ら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6842-6846）。

セリンプロテアーゼに関しては、in vitro の受精が各種のトリプシンインヒビターにより阻害されることから、精子が透明帯を通過する際、精子（特に先端）

に含まれるトリプシン様セリンプロテアーゼが透明帯を消化することが示唆されている (P.M. Saling (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6231-6235; D.A. Benau および B.T. Storey (1987) Biol. Reprod. 36, 282-292; D.Y. Liu および H.W. Baker (1993) Biol. Reprod. 48, 340-348)。従来は精子先端に存在するトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであるアクロシン (acrosin) がこの働きを担っていると考えられていた (C.R. Brown (1983) J. Reprod. Fertil. 69, 289-295; H. Kremling ら (1991) Genomics 11, 828-834; U. Klemm ら (1990) Differentiation 42, 160-166)。しかしそのノックアウトマウスがほぼ正常な受精をすることが判明し、アクロシン以外の精子に存在するセリンプロテアーゼが透明帯の消化を行っていることが示唆されている (T. Baba ら (1994) J. Biol. Chem. 269, 31845-31849; I.M. Adham ら (1997) Mol. Reprod. Dev. 46, 370-376)。ホヤではスベルモシン (spermosin) というトリプシンファミリーセリンプロテアーゼが精子で発現しており (H. Sawada ら (1984) J. Biol. Chem. 259, 2900-2904)、この特異抗体がホヤの受精を濃度依存的に阻害することが判明している (H. Sawada ら (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 499-504)。また、最近マウスの精子先端に特異的に発現しているトリプシンファミリーセリンプロテアーゼである TESP1、TESP2 の cDNA がクローニングされた (N. Kohno ら (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 245, 658-665)。しかし、この遺伝子が有する受精の際の役割はいまだ判明していない。これまでに透明帯を消化する働きを持つ、精子に存在するセリンプロテアーゼは報告されていない。

#### 発明の開示

本発明は、精子の形成や機能に関連する新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼおよびそれらをコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

本発明者らは、76A5sc2 と命名された遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応による増

幅の結果、76A5sc2 遺伝子とは異なる配列を有する遺伝子断片を見出した。本発明者らは、この遺伝子断片を基に、成体マウス精巣に特異的に発現する2つの新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ(「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」)の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAをクローニングし、さらにこれら遺伝子の組織における発現について解析した。

単離された「Tespec PRO-1」(Testis specific expressed serine proteinase-1)は321アミノ酸をコードすると予想され、その予想アミノ酸配列はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His」および「Trypsin-Ser」活性部位を有し、また他のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであるアクロシンやプロスタシン、トリプシンなどと、この2つのモチーフおよびその近傍において非常に高い相同性を示した。しかし、それ以外の領域においては核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知遺伝子は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

一方、「Tespec PRO-2」は319アミノ酸をコードすると予想され、「Trypsin-His」活性部位を保持していた。「Trypsin-Ser」活性部位については12アミノ酸よりなるモチーフ中、2アミノ酸がモチーフとは異なるが、他の既知トリプシンファミリーセリンプロテアーゼにおいてもこのような例は存在するため、「Tespec PRO-2」はプロテアーゼとして機能すると考えられる。「Tespec PRO-2」もまた、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知遺伝子は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

「Tespec PRO-2」には、興味深いことに「Tespec PRO-2」の前半領域と「Tespec PRO-1」の後半領域がつながったスプライシングアイソフォームが存在した。このため、これら2つのプロテアーゼは染色体上で非常に近い位置に存在することが示唆された。「Tespec PRO-2」には種々のスプライシングアイソフォームが存在するが、「Tespec PRO-2」以外のアイソフォームは長いORFが開かず、プロテアーゼをコードしていなかった。「Tespec PRO-1」および「Tespec PRO-2」は核酸レベル、

アミノ酸レベルでそれぞれ 52.2%、33.1%の相同性を有していた。

本発明者らは、また、マウス「Tespec PRO-2」の核酸配列を基に、RT-PCR 及び RACE を用いて、ヒト「Tespec PRO-2」の cDNA のクローニングを行った。これにより取得されたヒト「Tespec PRO-2」とマウス「Tespec PRO-2」は核酸レベル、アミノ酸レベルでそれぞれ 74.2%、69.8%の相同性を有することが判明した。また、ヒト「Tespec PRO-2」は第 8 染色体にコードされていることが判明した。

本発明者らはさらに、マウス「Tespec PRO-1」の核酸配列を基に、RT-PCR 及び RACE を用いて、ヒト「Tespec PRO-3」の cDNA のクローニングに成功した。また、ヒト「Tespec PRO-3」のカウンターパートであるマウス「Tespec PRO-3」の cDNA のクローニングにも成功した。

「Tespec PRO-1」をコードする領域をプローブとしたマウスノーザンブロットの解析より、この遺伝子は成体マウス精巣でのみ発現が見られ、他の組織や胎児期ではその発現は確認されなかった。同様に RT-PCR による解析からも、「Tespec PRO-1」の発現は成体精巣で非常に高いことが判明した。また、「Tespec PRO-1」は生後 18 日目以降の精巣で発現の上昇が確認できたが、生後 12 日目以前の精巣や精子形成不全の変異体マウス精巣ではその発現が全く見られなかった。同様な解析を「Tespec PRO-2」でも行ったところ、「Tespec PRO-1」と同様の発現パターンであることが判明した。これら事実「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」が、精子の分化・熟成または精子の機能（受精）に関与していることを示唆する。一方、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼに関しては、受精の際に重要な役割を担っていることが示唆されている。

従って、本発明者らは、見出した遺伝子によりコードされるタンパク質が、受精の鍵となるセリンプロテアーゼである可能性があり、新しい不妊症の治療薬や不妊症診断薬の開発、あるいは新しい避妊薬の開発に有用であると考えた。

本発明は、精子の形成や機能に関連すると考えられる新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ、それらをコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法お

よび用途に関し、より具体的には、

1. 配列番号：2、4、6、8、10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
2. 配列番号：2、4、6、8、10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等な、下記（a）または（b）に記載のタンパク質、
  - （a）配列番号：2、4、6、8、10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなるタンパク質、
  - （b）配列番号：1、3、5、7、9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質、
3. （1）または（2）に記載のタンパク質の部分ペプチド、
4. （1）または（2）に記載のタンパク質と他のペプチドとからなる融合タンパク質、
5. （1）～（3）のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、
6. （5）に記載のDNAが挿入されたベクター、
7. （5）に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、
8. （7）に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、（1）～（3）のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、
9. （1）または（2）に記載のタンパク質の基質をスクリーニングする方法であって、
  - （a）該タンパク質に被検試料を接触させる工程、
  - （b）該タンパク質の被検試料に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および
  - （c）該プロテアーゼ活性により分解または切断を受ける化合物を選択する工程、を含む方法、

10. (9)に記載の方法により単離されうる、(1)または(2)に記載のタンパク質の基質、

11. (1)または(2)に記載のタンパク質の活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該タンパク質に(10)に記載の基質を接触させる工程、

(b) 該タンパク質による該基質に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該プロテアーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

12. (11)に記載の方法により単離されうる、(1)または(2)に記載のタンパク質の活性を阻害する化合物、

13. (1)または(2)に記載のタンパク質に結合する抗体、

14. (13)に記載の抗体と、(1)または(2)に記載のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該タンパク質を検出又は測定する方法、

15. 配列番号：1、3、5、7または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するヌクレオチド、を提供するものである。

本発明は、新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼを提供する。本発明のタンパク質に含まれる「Tespec PRO-1」と命名されたマウスタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に、「Tespec PRO-2」と命名されたマウスおよびヒタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：4および6に、また「Tespec PRO-3」と命名されたマウスおよびヒタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：8および10に示し、それらのタンパク質をコードするcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：1、3、5、7および9に示す。

本発明のタンパク質に含まれる「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」は、マウス精巣において高い発現が観察された（実施例 5 および 6）。これらのタンパク質は精子、特にその先端領域に存在するならば、精子が透明帯を消化し受精を成立させる際の鍵となるプロテアーゼである可能性がある。従って、本発明のタンパク質は、不妊症治療薬や不妊症診断薬あるいは避妊薬の開発に有用であると考えられる。

また、本発明のタンパク質にはマウス「Tespec PRO-1」タンパク質、マウス「Tespec PRO-2」タンパク質、ヒト「Tespec PRO-2」タンパク質、マウス「Tespec PRO-3」タンパク質、またはヒト「Tespec PRO-3」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。ここで「機能的に同等」とは、マウス「Tespec PRO-1」タンパク質、マウス「Tespec PRO-2」タンパク質、ヒト「Tespec PRO-2」タンパク質、マウス「Tespec PRO-3」タンパク質、またはヒト「Tespec PRO-3」タンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。生物学的特性としては、例えば、①活性の特性として、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性を有すること、②配列の構造的特性として、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフ（「Trypsin-His (PROSITE PS00134)」、「Trypsin-Ser (PROSITE PS00135)」）および／またはそれと類似した配列を有することや、マウス「Tespec PRO-1」タンパク質、マウス「Tespec PRO-2」タンパク質、ヒト「Tespec PRO-2」タンパク質、マウス「Tespec PRO-3」タンパク質、もしくはヒト「Tespec PRO-3」タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性が見られること（後述）、③発現特性として、精巣に発現すること、などが挙げられる。

このようなタンパク質を得るための方法としては、例えば、タンパク質のアミノ酸配列に変異を導入する方法が用いられている。アミノ酸配列に変異が導入されたタンパク質を得るためには、例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法(Kramer, W. and Fritz, H. J. Methods in Enzymol. (1987) 154, 350-367) や PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL 社)、

Kunkel 法 (Methods Enzymol. 85, 2763-2766(1988)) を使用することができる。  
これらの方法により、配列番号：2、4、6、8または10に示されたアミノ酸配列からなるタンパク質において、その生物学的特性に影響を与えないよう、1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加、挿入及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたタンパク質を得ることができる。

変異するアミノ酸の個数は、配列番号：2、4、6、8または10に示されたアミノ酸配列からなるタンパク質の生物学的特性を保持しうる限り特に制限はない。配列番号：2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列に1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号：2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。また、アミノ酸の変異部位も、配列番号：2、4、6、8または10に示されたアミノ酸配列からなるタンパク質の生物学的特性を保持しうる限り特に制限はない。

あるアミノ酸配列に対する1または複数個のアミノ酸残基の欠失、付加および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

例えば、本発明のタンパク質に1または複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質として、融合タンパク質が挙げられる。融合タンパク質は、本発明のタ



ンパク質と他のペプチドとが融合したものである。融合タンパク質は人為的に作製することもできる。例えば、本発明のタンパク質をコードする DNA と他のペプチドをコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、特に限定されない。例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個の His (ヒスチジン) 残基からなる 6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒト c-myc の断片、VSV-GP の断片、p18HIV の断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。またタンパク質としては、例えば GST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードする DNA を融合させたものを用いることができる。

また、当業者にとっては、周知技術であるハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を用いて、上記本発明のタンパク質をコードする DNA (配列番号: 1、3、5、7 または 9 に記載の DNA) またはその一部を基に、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも当業者が通常行い得ることである。本発明のタンパク質には、ストリンジェントな条件下で上記本発明のタンパク質をコードする DNA またはその一部とハイブリダイズする DNA がコードし、上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。ハイブリダイズする DNA を他の生物から単離する場合、生物種に制限はないが、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、サル、ブタなどを挙げることができる。「ストリンジェントな条件」とは、通常、「42°C、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、好ましくは「50°C、2xSSC、0.1% SDS」

程度であり、さらに好ましくは「65°C、2xSSC、0.1% SDS」程度である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。

ハイブリダイズ技術により得られた DNA がコードするタンパク質は、通常、配列番号：2、4、6、8または10に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有する。

「高い相同性」とは、少なくとも60%以上の相同性、好ましくは70%以上の相同性、さらに好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明のタンパク質は、該タンパク質を産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態が異なってもよい。得られたタンパク質が配列番号：2、4、6、8または10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の生物学的特性を保持している限り、本発明のタンパク質に含まれる。

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質として、また遺伝子組換え技術を利用して組み換えタンパク質として製造することが可能である。天然のタンパク質は、本発明のタンパク質が存在すると考えられる組織若しくは細胞（例えば精巣）からタンパク質を抽出し、後述する本発明の抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより調製することができる。

また、組み換えタンパク質を製造するには、本発明のタンパク質をコードする DNA を発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込み、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、タンパク質を発現させることができる。

具体的には、例えば、哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明のタンパク質をコードする DNA、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させた DNA あるいはそれを含むベクターを構築する

ことができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他にタンパク質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス 40 (SV40) 等のウイルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等を用いることができる。

例えば、SV40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulligan らの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

複製開始点としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZ プロモーター、araB プロモーターを挙げることができる。lacZ プロモーターを使用する場合、Ward らの方法 (Nature (1978) 271, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araB プロモーターを使用する場合、Better らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169,

4379) を使用すればよい。

本発明のタンパク質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター「pAdexLcw」やレトロウイルスベクター「pZIPneo」などが挙げられる。また哺乳動物由来の発現ベクター、例えば pEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えば pBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えば pMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えば pHSV、pMV、pAdexLcw、レトロウイルス由来の発現ベクター。例えば pZIPneo、酵母由来の発現ベクター、例えば pNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えば pPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えば pQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2、pREP4 が挙げられる。

本発明において、タンパク質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば サッカロミセス・セレビシエ

(*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。真核細胞であれば例えば、培養液として DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は約 6~8 であるのが好ましい。培養は通常約 30~40°C で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とする DNA を導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。例えば、目的とする DNA をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。この DNA が挿入された融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁からタンパク質を得る。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とする DNA を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望のタンパク質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上記で得られた本発明のタンパク質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドも含む。このようなペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に結合する抗体を得るための免疫原として利用しうる。この場合、ペプチドは、少なくとも12アミノ酸以上の鎖長を有し、好ましくは、20アミノ酸以上の鎖長を有する。本発明のタンパク質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

遺伝子工学的手法を利用して宿主内で発現させた本発明のタンパク質若しくはその部分ペプチドは、細胞内外から単離し実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の

液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA は、*in vivo*、*in vitro* で本発明のタンパク質を製造するのみならず、例えば、哺乳動物、例えばヒトの遺伝子治療に用いることもできる。特に、本発明の遺伝子は、不妊症の遺伝子治療への応用が期待される。遺伝子治療に用いる場合には、本発明の DNA が挿入されたベクターを生体内の標的部位へ投与する。投与方法は、*ex vivo* 法であっても、*in vivo* 法であってもよい。なお、本発明のベクターには、このように遺伝子治療に用いられるベクターも含まれる。

本発明のタンパク質をコードするゲノム DNA 又は cDNA は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術を用いて、それぞれゲノムライブラリーまたは cDNA ライブラリー等をスクリーニングして得ることができる。

得られた DNA 又は DNA 断片をプローブとして、さらにゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる細胞、組織、臓器又は種から遺伝子を得ることができる。ゲノムライブラリーまたは cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNA ライブラリーを用いてもよい。

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。

具体的には、例えば次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現



する細胞、組織、臓器から mRNA を単離する。mRNA の単離は公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全 RNA から mRNA を精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-AmplifINDER RACE Kit(Clontech 製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた 5'-RACE 法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) に従い、cDNA の合成および増幅を行うことができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を調製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

また、本発明の DNA は、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-r74)。また、本発明の DNA を市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当な DNA フラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終始コドン (TAA、TGA 又は TAG) の挿入等が挙げられる。

本発明の DNA は、具体的には例えば配列番号：1 の塩基配列において 48 位の塩基 A から 1010 位の塩基 C からなる DNA、配列番号：3 の塩基配列において 69 位

の塩基 A から 1025 位の塩基 C からなる DNA、配列番号：5 の塩基配列において 73 位の塩基 A から 867 位の塩基 A からなる DNA、配列番号：7 の塩基配列において 38 位の塩基 A から 1000 位の塩基 A からなる DNA、配列番号：9 の塩基配列において 41 位の塩基 A から 1096 位の塩基 C からなる DNA を包含する。

本発明の DNA はまた、配列番号：1、3、5、7 または 9 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、且つ本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を含む。

「ストリンジントな条件」とは、通常、「42°C、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、好ましくは「50°C、2xSSC、0.1% SDS」程度であり、さらに好ましくは「65°C、2xSSC、0.1% SDS」程度である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。

上記のハイブリダイズする DNA は、例えば天然由来の DNA（例えば cDNA 又はゲノム DNA）であってよい。天然由来の DNA の場合、機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するための生物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、サル、ブタなどが挙げられる。例えばこれらの生物において、実施例において本発明のタンパク質をコードする cDNA とハイブリダイズする mRNA が検出される組織（例えば精巣）由来の cDNA を用いて本発明の DNA を単離することができる。また、本発明のタンパク質をコードする DNA は cDNA やゲノム DNA の他、合成 DNA であってもよい。

また、本発明は、本発明のタンパク質の基質のスクリーニング方法を提供する。本発明のタンパク質の「基質」とは、本発明のタンパク質が結合することにより特定の部位で分解または切断を受ける化合物を指す。

基質となる化合物としては、タンパク質に制限されない。例えば、トリプシン (trypsin) やキモトリプシン (chymotrypsin) は、タンパク質のみならず、ペプチド化合物の誘導体のアミド結合やエステル結合も切断することが知られている

(Farmer, D.A., et al., J Biol Chem. (1975) 250 , 7366-7371; del Castillo, L.M., et al., Biochim Biophys Acta. (1971) 235, 358-69)。従って、本発明において、基質としては本発明のタンパク質が結合することにより特定の部位で分解または切断を受ける限り限定されず、ペプチドやその類縁体、誘導体（ペプチド性化合物）、または非ペプチド性化合物などでもよい。

本発明の基質のスクリーニング方法は、(a)本発明のタンパク質に被検試料を接触させる工程、(b)本発明のタンパク質の被検試料に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および(c)本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性により分解若しくは切断を受ける化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに使用される被検試料としては、本発明のタンパク質の基質を含むことが期待される試料であれば特に制限はなく、例えば、細胞抽出液、動物組織抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、ペプチドの類縁体若しくは誘導体、非ペプチド性化合物、合成化合物、天然化合物などが挙げられる。

本発明のタンパク質に結合する基質のスクリーニングにおいては、例えば、本発明のタンパク質と被検試料とを混合し、インキュベートした後、被検試料の変化（切断、分解）を測定する。例えば、タンパク質を被検試料とする場合、被検試料を直接、またはアジド化したり、蛍光物質と結合させ、反応前後の試料の変化をUVスペクトル (R. J. Beynon and J. S. Bond, Proteolytic enzymes (1989) IRL press 25-55)や、HPLC (Maier M, et al. (1988) FEBS Lett. 232, 395-398, Gau W, et al. Adv Exp Med Biol. (1983) 156, 483-494) で検出し、プロテアーゼ活性を測定することができる。

また、ペプチド（及び類縁体、誘導体）を被検試料とする場合、数アミノ酸（1～5アミノ酸の場合が多いが、特に制限はない）からなるペプチド（及び類縁体、誘導体）を本発明のタンパク質と混合し、インキュベート後被検試料の変化を測定する。例えば、被検試料のカルボキシル末端に蛍光性化合物 (MEC; Kawabata S,

et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172, 17-25, AMC; Morita T, et al. (1977) J Biochem (Tokyo). 82, 1495-1498, AFC; Garrett JR, et al. (1985) Histochem. J. 17, 805-817, など)を導入しておき、被検試料が切断を受けた際に生じる蛍光性化合物のスペクトル変化を指標にプロテアーゼ活性を測定すればよい。また、その他の蛍光標識ペプチド基質を用いたスクリーニング方法を用いることもできる (R. J. Beynon and J. S. Bond, Proteolytic enzymes (1989) IRL press 25-55, Gossrau R, et al. (1984) Adv Exp Med Biol. 167, 191-207, Yu JX, et al. (1994) J Biol Chem. 269, 18843-18848)。

また、上記方法の原理を利用して、被検化合物として合成化合物、または天然物バンク、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリー、もしくはピンペプチド合成物等を用いてスクリーニングすることや、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットスクリーニングも可能である (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9)。

上記スクリーニング方法を利用して、本発明のタンパク質の基質が単離されれば、本発明のタンパク質の該基質に対するプロテアーゼ活性を阻害する活性を指標に、本発明のタンパク質の阻害剤をスクリーニングすることができる。従って、本発明は、また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

この方法は、(a)被検試料の存在下で本発明のタンパク質にその基質を接触させる工程、(b)本発明のタンパク質の該基質に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および(c)被検試料が非存在下において検出した場合と比較して、該

プロテアーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに使用される本発明のタンパク質としては、天然のタンパク質、組換えタンパク質、またはそれらの部分ペプチドであってもよい。また、スクリーニングに使用される被検試料としては、特に制限はなく、例えば、細胞培養上清、遺伝子ライブラリーの発現産物、ペプチド、ペプチドの類縁体若しくは誘導体、精製若しくは粗精製タンパク質（抗体を含む）、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液、が挙げられる。

本発明のタンパク質の阻害剤のスクリーニングは、例えば、上記文献「R. J. Beynon and J. S. Bond, Proteolytic enzymes (1989) IRL press 25-55; Maier M, et al. (1988) FEBS Lett. 232, 395-398; Gau W, et al. Adv Exp Med Biol. (1983) 156, 483-494); Kawabata S, et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172, 17-25,; Morita T, et al. (1977) J Biochem (Tokyo). 82, 1495-1498; Garrett JR, et al. (1985) Histochem. J. 17, 805-817; Gossrau R, et al. (1984) Adv Exp Med Biol. 167, 191-207, Yu JX, et al. (1994) J Biol Chem. 269, 18843-18848」に記載の系を利用して行なうことができる。また、ペプチド性基質をリード化合物とし、その構造の一部を修飾したり置換した化合物を、本発明のタンパク質の阻害剤スクリーニングにおける被検化合物として用いることも可能である (Okamoto S, et al. (1993) Methods Enzymol. 222, 328-340 )。

上述したように、本発明のタンパク質は、その発現特性等から、精子の分化・熟成または精子の機能（受精）に関与していることが示唆される。本発明のスクリーニング方法により単離される上記阻害剤は、本発明のタンパク質の受精への関与を解析するために利用しうる。例えば、本発明のタンパク質の阻害剤を用いて、インビトロ受精解析 (Y. Toyoda et al., 1971, Jpn. J. Anim. Reprod. 16: 147-151; Y. Kuribayashi et al., 1996, Fertil. Steril. 66: 1012-1017) を行い、該阻害剤が受精を阻害するか否かを検討することにより、本発明のタンパク

質の受精への関与を判定することができる。受精を阻害する本発明のタンパク質の阻害剤には、例えば、新たな避妊薬としての利用が考えられる。

本発明のスクリーニング方法を利用して得られる化合物をヒトや他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明のタンパク質と結合活性を有する化合物を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油のような天然産出植物油を溶解又は懸濁させるための通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、

ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80(TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

本発明のスクリーニング方法により得られる化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.1 から 100mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg である。

非経口的に投与する場合は、その 1 回の投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体を提供する。このような抗体は、本発明のタンパク質の検出や精製などに利用しうる。また、上述した *in vitro* 受精解析において利用しうる。抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

本発明のタンパク質に対して特異的に結合する抗体は、タンパク質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、本発明のタンパク質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを用いることができる。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えばタンパク質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本発明における「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に結合する抗体を意味する。

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得、このタンパク質を感作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。モノクローナル抗体を作成する場合は、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル (旧世界ザル)、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することによ



り行われる。具体的には、感作抗原を PBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば EB ウイルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* でタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭 63-17688 号公報）。

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際公開 92-03918 号、国際公開 93-2227 号、国際公開 94-02602 号、国際公開 94-25585 号、国際公開 96-33735 号および国際公開 96-34096 号参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子(*oncogene*)により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードする DNA をハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv 又は H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成

させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も含まれる。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来の CDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来の FR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で正在されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 等により行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISA を用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識

するに次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia 製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、前記抗体とタンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

また、本発明は、配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列からなるDNA（その相補鎖を含む）と特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは上記したストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このようなヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードするDNAを検出、単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用可能である。特異的なハイブリダイゼーションのためのストリンジェンシーは、ハイブリダイズ反応の温度、反応時間、プローブ又はプライマー濃度、プローブ又はプライマーの長さ、塩強度などを考慮することにより、当業者であれば適宜選択することができる。

本発明のマウス「Tespec PRO-1」および「Tespec PRO-2」遺伝子は精巣に特異的に発現し、またマウスにおいて生後18日以降、生殖細胞に特異的に発現していると考えられる。このため、これらのDNAは生殖細胞のマーカー（検査薬）としても利用することが可能である。また、本発明の遺伝子は、精子の分化・成熟、

および／または受精の成立を含む精子の機能に関与している可能性が考えられるため、これら DNA は、不妊症の検査に利用することも考えられる。

また、「配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列からなる DNA（その相補鎖を含む）と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するヌクレオチド」には、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムも含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードする DNA 又は mRNA に結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNA の分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列中の連続する少なくとも 15 個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも 15 個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、DNA 又は mRNA の所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA 又は mRNA とオリゴヌクレオチドとが配列番号：1、3、5、7または9に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1 又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。このようなオリゴヌクレオチドとしては、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも 70%、

好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは、上記した文献に記載のアルゴリズムを使用すればよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は *in vivo* でも *in vitro* でも適用できる。また、患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用してもよい。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボソーム、ポリ-L-リジン、リビッド、コレステロール、リボフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg 好ましくは 0.1~50mg/kg の範囲で投与することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、マウス「Tespec PR0-1」の cDNA 配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリ A シグナルを波線で示した。

図 2 は、マウス「Tespec PR0-2」の cDNA 配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリ A シグナルを波線で示した。

図3は、マウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」および既知のプロテアーゼのアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。全てで一致するアミノ酸は「\*」で、類似するアミノ酸は「・」で表した。またトリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を枠で囲んで示した。

図4は、マウス精巣の RT-PCR による「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」cDNA の増幅結果を表す図である。上段に使用したプライマーの位置を、下段に RT-PCR による増幅産物の電気泳動の図を示す。

図5は、マウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」およびそれらのスプライシングアイソフォームの構造を表す模式図である。長方形の下に数字は塩基数を示す。

図6は、RT-PCR によるマウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」の組織での発現を表す図である。上段に使用したプライマーの位置を、下段に RT-PCR による増幅産物の電気泳動の図を示す。1 ; 肝臓、2 ; 脳、3 ; 胸腺、4 ; 心臓、5 ; 肺、6 ; 脾臓、7 ; 精巣、8 ; 卵巣、9 ; 腎臓、10 ; 10~11 日目胎児、11 ; 蒸留水 (対照)。

図7は、ノーザンブロットによるマウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」の組織での発現を表す図である。上段に使用したプローブの位置を、下段にノーザンブロットの結果を示す。1 ; 7 日胚、2 ; 11 日胚、3 ; 15 日胚、4 ; 17 日胚、5 ; 心臓、6 ; 脳、7 ; 脾臓、8 ; 肺、9 ; 肝臓、10 ; 骨格筋、11 ; 腎臓、12 ; 精巣。

図8は、RT-PCR 解析によるマウス「Tespec PRO-1」、「Tespec PRO-2」の精巣での発現時期を示す図である。1 ; W/Wv No.1 精巣、2 ; W/Wv No.2 精巣、3 ; W/Wv No.3 精巣、4 ; 生後 4 日 精巣、5 ; 生後 8 日 精巣、6 ; 生後 12 日 精巣、7 ; 生後 18 日 精巣、8 ; 生後 42 日 精巣、9 ; 成体 精巣、10 ; 成体 肝臓、11 ; 蒸留水 (対照)。

図9は、ヒト「Tespec PRO-2」の cDNA 配列およびアミノ酸配列を示す図である。

トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

図10は、マウスおよびヒト「Tespec PR0-2」の塩基配列の比較を示す図である。2つで一致する塩基は枠で囲んだ。

図11は、マウスおよびヒト「Tespec PR0-2」のアミノ酸配列の比較を示す図である。2つで一致するアミノ酸は「\*」で、類似するアミノ酸は「・」で示した。また、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を枠で囲んだ。

図12は、ヒト「Tespec PR0-2」の染色体マッピングのためのPCRの結果を示す図である。

図13は、ヒト「Tespec PR0-3」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

図14は、「Tespec PR0-1」および「Tespec PR0-3」の塩基配列の相同性の比較を表す図である。なお、塩基配列の相同性は、マウス「Tespec PR0-1」においては全長塩基配列、マウス「Tespec PR0-3」においては約400bpのEST領域、ヒト「Tespec PR0-3」においては実施例9に記載の低ストリンジェンシーRT-PCRで取得した約200bpの領域を比較した。

図15は、マウス「Tespec PR0-3」のcDNA配列およびアミノ酸配列を示す図である。トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ活性部位を下線で示した。また、ポリAシグナルを波線で示した。

図16は、マウス「Tespec PR0-3」(m. Tespec PR0-3)およびヒト「Tespec PR0-3」(h. Tespec PR0-3)の塩基配列の比較を示す図である。2つで一致する塩基は枠で囲んだ。

図17は、マウス「Tespec PR0-3」(m. Tespec PR0-3)およびヒト「Tespec PR0-3」(h. Tespec PR0-3)のアミノ酸配列の比較を示す図である。2つで一致するアミノ酸残基は枠で囲んだ。



### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### [実施例 1] 「Tespec PRO-1」遺伝子断片の単離

Mouse heart cDNA plasmid library (GIBCO 社,  $5 \times 10^9$  cfu/ml) から、 $5 \times 10^4$  クローンからなるプラスミドを単離、精製し、これを鋳型として、本発明者らが「76A5sc2」と命名した遺伝子に由来する遺伝子特異的プライマー「76A5sc2-B」とベクタープライマー「SPORT RV」を用いて以下の様に PCR をおこなった。

SuperScript Mouse heart cDNA library 及び SuperScript Mouse testis cDNA library (GIBCO 社,  $5 \times 10^9$  cfu/ml) を 100 倍に希釈したものを、16 本の 3ml LB-Amp 培地に  $1 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $30^\circ\text{C}$  で培養したのち QIASpin mini prep kit (QIAGEN 社) でプラスミドを得た (このプラスミドにはそれぞれ  $5 \times 10^4$  の独立なクローンが存在する)。マウス心臓由来のプラスミドを鋳型とし、76A5sc2-B (配列番号: 11 / 5' GAT CMA CAG GTG CCA GTC ATC A 3') と SPORT SP6 (配列番号: 12 / 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3') のプライマーで、Ampli Taq Gold (Perkin Elmer 社) をポリメラーゼとして用い、 $95^\circ\text{C}$  12 分の後、「 $96^\circ\text{C}$ , 20 秒、 $55^\circ\text{C}$ , 20 秒、 $72^\circ\text{C}$ , 2 分」 $\times 40$  サイクル、続いて  $72^\circ\text{C}$  3 分の条件で PCR をおこなった。

PCR 反応液を 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い約 0.7Kb の PCR 生成物を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) で PCR 生成物を回収した。この PCR 生成物を pGEM T easy vector (PROMEGA 社) に T4 DNA ligase (PROMEGA 社) を用いて TA クローニングした。

出現したコロニーから 8 つを選択し、コロニー PCR により挿入断片を以下のようにして増幅した。

SPORT FW (配列番号: 13 / 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3')、SPORT RV (配列番号: 14 / 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3') 及び KOD dash ポリメラーゼを

含む 20  $\mu$ l の PCR 反応溶液に組み替え体を持つコロニーを直接懸濁し、94°C 1 分の後、「96°C 15 秒、55°C 5 秒、72°C 25 秒」を 32 サイクルの条件で PCR をおこなった。

増幅された PCR 生成物はアガロースゲル電気泳動で確認し、必要に応じて PCR 生成物を Microspin S-300 あるいは S-400 ゲルろ過(Pharmacia 社)で精製した。

シーケンス反応のテンプレートとして、上記のコロニーPCR や RT-PCR などの PCR 産物を用いてシーケンスを行った。PCR 反応後アガロースゲル電気泳動で生成物を確認し、夾雑物が混入している場合はアガロースゲルより目的 PCR 産物を切り出し、そうでない場合は上記のゲルろ過で精製した。シーケンス反応は Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit、または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit (Perkin-Elmer 社)を用いたサイクルシーケンシングを行った。プライマーには、SPORT FW および SPORT RV を用いた。未反応のプライマー、ヌクレオチド等を 96 well precipitation HL kit (AGTC 社)で除去し、ABI 377 あるいは ABI 377XL DNA Sequencer (Perkin -Elmer 社)で塩基配列を決定した。

その結果、7 つは 76A5sc2 由来の塩基配列であったが、1 つは (インサートサイズ約 0.5Kb) 異なる塩基配列を持っていた。そこでこの塩基配列を GCG のデータベースサーチで解析した。また、この塩基配列は ORF が開いていたのでアミノ酸に翻訳し、アミノ酸配列も GCG のデータベースで解析した。その結果、この遺伝子断片は核酸及びアミノ酸レベルで多数の既知トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ (trypsin family serine proteinase) と一部の領域で相同性を持っていることが判明した。しかしこの遺伝子断片の全領域において高い相同性を示す既知遺伝子はなく、新規な遺伝子であることが判明した。また、このアミノ酸配列はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His (PROSITE PS00134)」モチーフを有することが判明し、新規なプロテアーゼの断片

であることが示唆された。

〔実施例 2〕 「Tespec PRO-1」 遺伝子の全長 cDNA のクローニング

実施例 1 において SuperScript Mouse heart cDNA library より得たプラスミドをテンプレートとし、実施例 1 で単離された遺伝子断片より新たにデザインした No9-C (配列番号: 1 5 / 5' ATG CTT CTG CTA TCG TGG AAG G 3') とベクタープライマー SPORT FW あるいは SPORT T7 (配列番号: 1 6 / 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') のプライマーセット、及び該遺伝子断片より新たにデザインした No9-B (配列番号: 1 7 / 5' CTT TGT GCT GAG GTC TTC AGT G 3') とベクタープライマー SPORT RV のプライマーセットで Ampli Taq Gold をポリメラーゼとして用いて plasmid library RACE をおこなった。PCR 反応は 95°C 12 分の後、「96°C 20 秒、55°C 20 秒、72°C 5 分」×42 サイクル、次いで 72°C 3 分の条件でおこなった。

PCR 反応液をアガロースゲルで電気泳動し、PCR 産物の確認を行った。さらにこれら PCR 産物について、直接または pGEM T easy vector にクローニングしたのち塩基配列を決定した。

3' RACE をおこなったところ、2 つの PCR バンドが得られたのでその塩基配列を決定した。一方のバンドの塩基配列は他方のバンドの塩基配列の途中に poly A が付加したものであった。

一方、5' RACE の結果も同様に、PCR 産物は長短 2 つのバンドを与えたので、それぞれのバンドをサブクローニングした後、塩基配列を決定した。その結果、この両者の 3' 側の塩基配列は同一であり、スプライシングアイソフォーム (splicing isoform) であることが判明した。

5' RACE で出現した短い方のバンドと、3' RACE の長い方のバンドの塩基配列をつなぎあわせることによりプロテアーゼをコードする塩基配列が得られたので、これを「Tespec PRO-1」(Testis specific expressed serine proteinase-1) と名付けた。

得られた「Tespec PRO-1」cDNA は 1033 塩基で、321 アミノ酸をコードしている

と予想される(図1)。その塩基配列を配列番号:1に、アミノ酸配列を配列番号:2に示す。アミノ酸配列にはN末端にシグナルペプチドと思われる疎水性アミノ酸領域が存在し、またC末端にも疎水性アミノ酸に富む領域が存在していた。このアミノ酸配列はGCGでの解析結果からトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His (PROSITE PS00134)」および「Trypsin-Ser (PROSITE PS00135)」を持つことが判明した。PROSITEによれば、「あるタンパク質がセリンおよびヒスチジン活性化部位の両方を有している場合は、そのタンパク質がトリプシンファミリーセリンプロテアーゼである確率は100%である ("if a protein includes both the serine and histidine active site signatures, the probability of it being a trypsin family serine protease is 100%")」とされている(S. Brenner, 1988, Nature 334: 528-530; N.D. Rawlings and A.J. Barrett, 1994, Meth. Enzymol. 244: 19-61)ため、「Tespec PRO-1」はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであると考えられる。この遺伝子について塩基配列及びアミノ酸配列についてGCGのデータベースサーチをおこなった。その結果上述の2つのモチーフとその近傍ではアクロシンやプロスタシン、トリプシンなど既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼと高い相同性を示し、またプロテアーゼ活性に必要なアスパラギン酸残基や、プロテアーゼ活性に必要と思われる分子内ジスルフィド結合に必要なシステインの位置も他のプロテアーゼと比較してよく保存されていた(図3)。しかしそれ以外の領域においては、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知の遺伝子、タンパク質は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

### 【実施例3】 「Tespec PRO-2」遺伝子の全長cDNAのクローニング

実施例2において「Tespec PRO-1」のクローニングの際の5' RACEで取得できた分子量の大きいバンド(5'側で「Tespec PRO-1」ではない塩基配列を持つ)について、その塩基配列より新たに合成したプライマー(No9-GあるいはNo9-J)を用いて、実施例1に示した SuperScript Mouse testis cDNA library から得たブ

ラスミドをテンプレートとし、更に 3' 及び 5' RACE をおこなった。

具体的には、No9-G (配列番号 : 1 8 / 5' CAG TCA ATG TCA CTG TGG TCA T 3') と SPORT FW、及び No9-J (配列番号 : 1 9 / 5' ACT TGC CGT TGG TGC CCA CTT C 3') と SPORT RV のプライマーセットで Ampli Taq Gold をポリメラーゼとして用い、95°C 12 分の後、「96°C 20 秒、55°C 20 秒、72°C 5 分」×42 サイクル、次いで 72°C 3 分の条件で PCR をおこなった。

PCR 産物について、直接または pGEM T easy vector にクローニングしたのち塩基配列を決定した。

3' RACE をおこない、2 つの 3' RACE 産物を得た。両者の塩基配列を決定したところ、両者とも 5' 側の塩基配列は同一であるが、3' 側の塩基配列が異なっていた。一方は上述した「Tespec PRO-1」の塩基配列の途中に poly A が付加したものと同じであった。他方の 3' 側の塩基配列は「Tespec PRO-1」のものとは異なる配列を持っていた。

5' RACE をおこなうと、マルチバンドを与えたのでサブクローニングをした後、それらの塩基配列を決定した。その結果これらはすべて 3' 側の配列が共通であり、スプライシングアイソフォームであることが判明した。その内の 1 つは長い ORF が開いており、この 5' RACE 産物と、先に述べた 3' 側の塩基配列が「Tespec PRO-1」のものとは異なる 3' RACE 産物をつなぎあわせることにより、プロテアーゼをコードすると思われる塩基配列が得られたので、これを「Tespec PRO-2」と名付けた。その塩基配列を配列番号 : 3 に、アミノ酸配列を配列番号 : 4 に示す。

得られた「Tespec PRO-2」cDNA は 1034 塩基で (図 2)、5' 非コード領域は 68 塩基であるのに対し 3' 非コード領域が 9 塩基と非常に短かく、また poly A シグナルも GATAAA と一般の mRNA (AAUAAA) よりも弱いと思われる。この cDNA より「Tespec PRO-2」は 319 アミノ酸をコードすると予想され、そのアミノ酸配列は N 末端にシグナルペプチドと思われる領域が存在するが、「Tespec PRO-1」とは異なり C 末端には疎水性アミノ酸に富む領域は存在しない。またこのアミノ酸配列

はトリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His」を持つが、「Trypsin-Ser」については12アミノ酸よりなるモチーフ（[DNSTAGC] - [GSTAPIMVQH] - X - X - G - [DE] - S - G - [GS] - [SAPHV] - [LIVMFYWH] - [LIVMFYSTANQH]）中、2アミノ酸がこのコンセンサスから外れている（GKCQGDSGAPMV）。しかし既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼにおいても、コンセンサス配列から数アミノ酸異なった配列を持つものも存在するため、取得した「Tespec PRO-2」も、プロテアーゼとして機能するものと思われる。

「Tespec PRO-2」についても塩基配列及びアミノ酸配列について、GCG のデータベースサーチをおこなった。その結果、「TespecPRO-1」同様上述の2つのモチーフとその近傍では、既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼと高い相同性を示し、またプロテアーゼ活性に必要なアスパラギン酸残基や、プロテアーゼ活性に必要なと思われる分子内ジスルフィド結合に必要なシステインの位置も他のプロテアーゼと比較してよく保存されていたが（図3）、それ以外の領域においては、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知の遺伝子、タンパク質は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

【実施例4】 「Tespec PRO-1」および「Tespec PRO-2」のサブライシングアイソフォーム

「Tespec PRO-1」と「Tespec PRO-2」の核酸及びアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ52.2%、33.1%であった。これらの値は他の既知トリプシンファミリーセリンプロテアーゼに対する相同性と同程度である。

実施例3の5' RACEで取得できた「Tespec PRO-2」のサブライシングアイソフォームは、サブライシングジャンクション部分や「Tespec PRO-2」では使用されない領域の塩基配列に終止コドンが現れ、長いORFを見出すことはできずプロテアーゼをコードしていないと考えられた。サブライシングアイソフォームを、RT-PCRを用いて以下の様により詳しく解析した。

cDNA クローニングによって得られた塩基配列を基に、No9-P (配列番号 : 2 0 /5' GCA CTG GAA TGA CAA CAT GAT GC 3' )、No9-Q (配列番号 : 2 1 /5' ATT GGC GTG GCA AGT AGG AGC A 3' )、No9-N (配列番号 : 2 2 /5' CGA GTC TCC CAG TTA GCA CAG A 3' )、No9-M' (配列番号 : 2 3 /5' CGG TGA CTT GGT CAT GTC TGT G 3' )、No9-K (配列番号 : 2 4 /5' GGA TCC ATG AAA CGA TGG AAG GAC AGA AG 3' )、No9-G、No9-J、No9-O (配列番号 : 2 5 /5' CGC AGA GTT CTG CTC ATA CAT A 3' )の各プライマーを合成した。これらを用い、マウスの組織より調製した cDNA をテンプレートとして、Ampli Taq Gold をポリメラーゼとして、95°C 12 分の後、「96°C 20 秒、60°C 20 秒、72°C 1 分」を 40 サイクル、次いで 72°C 3 分の条件で RT-PCR をおこなった。PCR 反応液は 1.5% Seakem GTG アガロース (TaKaRa 社) で電気泳動を行った。

RT-PCR による解析の結果 (図 4 および 5)、「Tespec PRO-2」のサブライシングアイソフォームのうち、5' 側が Box 2-I~2-III~2-VI というアイソフォームが主要であると思われ、「Tespec PRO-2」よりその存在は多いと思われる。また、Box 2-I を使用したアイソフォームとしては、Box 2-VI を経て Box 2-VII あるいは Box 1-II へとつながっていく cDNA (後者は「Tespec PRO-1」とのキメラ cDNA と思われる) が RT-PCR で確認できたが、Box 2-IIb を使用したアイソフォームとしては、Box 2-VI を経て Box 1-II へとつながっていく「Tespec PRO-1」とのキメラ型の cDNA のみが確認できた (図 4 および 5)。このことは、「Tespec PRO-2」と「Tespec PRO-1」が染色体上で非常に接近しており、また「Tespec PRO-2」の polyA シグナルが弱いために起きているものと思われる。また、このような一見無意味と思われるような (短いタンパク質しかコードできない) サブライシングアイソフォームが存在する意義は不明であるが、「Tespec PRO-2」の発現が転写時のみならずサブライシングによっても制御されている可能性も考えられる。

【実施例 5】 「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」遺伝子発現の組織分布

「Tespec PRO-1」と「Tespec PRO-2」の発現がどの組織で見られるかを RT-PCR

で確認した。成体マウスの10種の組織(肝臓、脳、胸腺、心臓、肺、脾臓、精巣、子宮、腎臓、10~11日目胎児)より単離した全RNA(Ambion社)をSuperScript II(GIBCO社)を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub>VNプライマーでcDNA合成をしRT-PCRのテンプレートとした。また、QUICK-Clone cDNA mouse 7day embryo, 17day embryo(CLONTECH社)もRT-PCRのテンプレートとして用いた。

「Tespec PRO-1」特異的プライマーとしてNo9-A(配列番号: 26/5' GGC ATG TAG CTC ACT GGC ATG 3')とNo9-Bを、「Tespec PRO-2」特異的プライマーとして29(-)(配列番号: 27/5' GGA CCA GCA AGA ATC AGT TCT G 3')と17(+)(配列番号: 28/5' CTG CTA CCA GTT CTA ATT TGC C 3')を用いた。G3PDHのコントロールプライマーとしてG3PDH 5'(配列番号: 29/5' GAG ATT GTT GCC ATC AAC GAC C 3')とG3PDH 3'(配列番号: 30/5' GTT GAA GTC GCA GGA GAC AAC C 3')を用いた。Ampli Taq Goldをポリメラーゼとして、95°C 12分の後、「96°C 20秒、60°C 20秒、72°C 30秒」×42サイクル(G3PDHの場合は28サイクル)、次いで72°C 3分の条件でPCRをおこなった。PCR反応液は1.5% Seakem GTG アガロース(TaKaRa社)で電気泳動を行った。

その結果、「Tespec PRO-1」及び「Tespec PRO-2」の両者とも精巣で高い発現が確認された(図6)。興味深いことに、この遺伝子はマウス心臓 cDNA プラスミドライブラリーよりクローニングしたにもかかわらず、心臓での発現はほとんどないことが判明した。また、精巣以外の組織においても、目的とする大きさのバンドが非常に弱いながらも観察された。

さらに、「Tespec PRO-1」のコーディング領域の一部(Box 1-II を完全に含む領域、110~401 核酸残基)、及び「Tespec PRO-2」の exon2-VI 付近(340~723 核酸残基)('Tespec PRO-2'には多くのスプライシングアイソフォームが存在し、このプローブはそれらの共通領域であるので「Tespec PRO-2」特異的なプローブではなく、「Tespec PRO-2」及びそのスプライシングアイソフォームを認識するものである)をプローブとして mouse MTN blot (CLONTECH 社) による組織分布を解



析した。

成体マウス精巣の cDNA をテンプレートとし、No9-A と No9-B のプライマーで増幅した RT-PCR 生成物を Megaprime DNA labelling system (Amersherm 社) を使用し  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP でラベリングし、未反応の  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP を除去したものを「Tespec PR0-1」プローブとした。同様に No9-G と No9-J のプライマーで増幅した後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP でラベリングしたものを「Tespec PR0-2」プローブとした。Mouse Multiple Tissue Northern (MTN) blot および Mouse Embryo Multiple Tissue Northern (MTN) blot (CLONTECH 社) を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH 社) 中で、添付マニュアルの方法に従い、68°C でハイブリダイゼーションを行った。

「Tespec PR0-1」のプローブを用いたところ、精巣にのみ約 1.2Kb のバンドが観察できた (図 7)。また、精巣以外の組織や胎児期にはこのバンドは観察できなかった。「Tespec PR0-2」のプローブを用いたところ、「Tespec PR0-1」と同様に精巣にのみ約 1.2Kb のバンドが観察でき (図 7)、精巣以外の組織や胎児期ではバンドは観察できなかった。

以上の結果より「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」の両者は精巣特異的な発現をしていることが判明した。

【実施例 6】 「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」遺伝子の精巣での発現時期

マウスにおいて原始生殖細胞は受精後 7 日目の胎児において出現し、生殖巣への移動 (受精後 11 日目) 後、前精原細胞へと分化をする (受精後 13 日目)。この前精原細胞はそれ以降停止期に入るが、出生後生殖幹細胞である精原細胞として自己増殖と精子への分化を開始する。精原細胞から精母細胞、精子細胞を経て熟成した精子へと分化するのに約 34 日かかる (実際には精原細胞にも分化段階があるためそれを含めると約 42 日である)。そのため出生後のマウスの精巣を経日的に採取し、そこでの「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」遺伝子の発現を確

認することで、これらの遺伝子がどの分化段階の精子で発現しているか、あるいは精巣内の支持細胞（セルトリ細胞やラディッヒ細胞）で発現しているかが判明する。

一方、突然変異体のマウスとして第 5 染色体異常に起因する W (White spotting) がある (P. Besmer ら (1993) Dev. Suppl., 125-137)。これは精原細胞及び精母細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼである c-kit に異常のある変異体で、これにより精巣内のセルトリ細胞やラディッヒ細胞などの支持細胞は正常であるにもかかわらず、生殖細胞が欠損したり（完全変異型）、精原細胞以降の分化が不全となったり（不完全変異型）する。そこでこの変異体マウス W/Wv の精巣での「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」の発現も確認した。

出生後 4 日、8 日、12 日、18 日、42 日のマウス精巣より単離した全 RNA、及び生後 56 日目の異なる 3 匹の W/Wv マウス精巣より単離した全 RNA を用いて作成した cDNA をテンプレートとして RT-PCR をおこなった。このとき同時に成体マウスの精巣、肝臓由来の cDNA を用いた RT-PCR も実施した。プライマーは上記実施例 5 の「Tespec PR0-1」特異的プライマー、「Tespec PR0-2」特異的プライマーを使用し、40 サイクル (G3PDH は 29 サイクル) の PCR を実施例 5 と同様に行った。

RT-PCR の結果、「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」は生後 18 日目以降の精巣で発現の上昇が見られたが、両遺伝子とも生後 12 日目以前及び W/Wv 変異体マウスの精巣では発現が全く認められなかった (図 8)。またネガティブコントロールとしておこなった肝臓においても、発現は確認できなかった。以上の結果は、「Tespec PR0-1」及び「Tespec PR0-2」の両者の発現が、セルトリ細胞やラディッヒ細胞のような支持細胞ではなく、生殖細胞が分化した精母細胞あるいは減数分裂後の精子細胞あたりから上昇していることを示唆する。

〔実施例 7〕 ヒト「Tespec PR0-2」全長 cDNA のクローニング

マウス「Tespec PR0-2」の塩基配列を基にしてヒト「Tespec PR0-2」のクロー

ニングをおこなった。ヒト精巢 poly A+ RNA (CLONTECH 社)を SuperScript II (GIBCO 社)を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub>VN プライマーで cDNA 合成をし RT-PCR のテンプレートとし、マウス「Tespec PRO-2」由来の No9-G と No9-Q をプライマーとして AmpliTaqGold をポリメラーゼとして、95°C 12 分の後、「96°C 20 秒、55°C 20 秒、72°C 30 秒」×42 サイクル、次いで 72°C 3 分の低ストリンジェンシーの条件で PCR をおこなった。

その結果得られた RT-PCR 産物について、直接塩基配列を決定した。その結果、この PCR 産物はマウス「Tespec PRO-2」の塩基配列と約 80%の相同性を持つ、ヒト「Tespec PRO-2」の遺伝子断片であることが判明した。この塩基配列を基に 5' RACE 用プライマーとして h-B (配列番号：3 1 / 5' AGA GGT CAC TGT CGA GCT GGG 3')、h-D (配列番号：3 2 / 5' TGT GAA TAA TGA CCT TCT GCA C 3')を、3' RACE 用プライマーとして h-A (配列番号：3 3 / 5' TTC AGC AAC ATC CAC TCG GAG A 3')、h-C (配列番号：3 4 / 5' AAG CAA GTG CAG AAG GTC ATT A 3')を作成し、human testis Marathon ready cDNA (CLONTECH 社)をテンプレートとして、添付マニュアルの方法に従いネステッド (nested) 3' 及び 5' RACE を実施した。その結果、ヒト「Tespec PRO-2」の全長 cDNA をクローニングすることに成功した。その塩基配列を配列番号：5 に、アミノ酸配列を配列番号：6 に示す。

ヒト「Tespec PRO-2」の cDNA は 1035 塩基で、265 アミノ酸をコードしていると予想される (図 9)。ヒト及びマウス「Tespec PRO-2」では、核酸及びアミノ酸レベルで互いにそれぞれ 74.2%、69.8%の相同性を持つが、マウス「Tespec PRO-2」に比較してアミノ酸配列の C 末端が 54 残基短く、それに伴い核酸配列の 3' 非コード領域が長くなっている (図 10, 11)。また、N 末端にはシグナルペプチドと思われる領域が存在し、C 末端領域も疎水性アミノ酸に富んでいる。ヒト「Tespec PRO-2」の予想されるアミノ酸配列には、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼモチーフである「Trypsin-His」を持つ。更に「Trypsin-Ser」については 12 アミノ酸よりなるモチーフ ([DNSTAGC] - [GSTAPIMVQH] - X - X - G -

[DE] - S - G - [GS] - [SAPHV] - [LIVMFYWH] - [LIVMFYSTANQH]) 中、1 アミノ酸 (GIFKGDSGAPLV) がこのコンセンサスから外れている (マウス「Tespec PRO-2」では1 2 アミノ酸モチーフ中2 アミノ酸がコンセンサスから外れている)。

データベースサーチの結果、取得したヒト「Tespec PRO-2」は、核酸およびアミノ酸レベルで高い相同性を示す既知の遺伝子、タンパク質は存在せず、新規なトリプシンファミリーセリンプロテアーゼであることが判明した。

#### [実施例 8] ヒト「Tespec PRO-2」の染色体マッピング

ヒト染色体パネル(CORRIELL CELL REPOSITORIES 社製)をテンプレートとし、h-A と h-F (配列番号: 3 5 / 5' CAT TGG TCG TTA CCC ACT GTG C 3') のプライマーで、Advantage cDNA polymerase (CLONTECH 社) をポリメラーゼとして、95°C 1 分の後、「96°C 15 秒、60°C 15 秒、68°C 30 秒」×37 サイクル、次いで 68°C 3 分の条件で PCR をおこなった。PCR 反応液は 1.5% Seakem GTG アガロース (TaKaRa) で電気泳動を行った。

電気泳動の結果を基に染色体マッピングを行った結果、ヒト「Tespec PRO-2」は第 8 染色体上に存在することが判明した (図 1 2)。

#### [実施例 9] ヒト「Tespec PRO-3」遺伝子の全長 cDNA クローニング

ヒト精巣 poly A<sup>+</sup> RNA (CLONTECH 社) を SuperScript II (GIBCO 社) を逆転写酵素として用い、(dT)<sub>30</sub> VN プライマーで cDNA 合成をし RT-PCR のテンプレートとし、マウス「Tespec PRO-1」由来の塩基配列より合成した PRO1-E (配列番号: 3 6 / 5' ATT CTC AAT GAG TGG TGG GTT CT 3') と PRO1-D (配列番号: 3 7 / 5' CCA GCA CAC AGC ATA TTC TTG G 3') をプライマーとして用い、AmpliTaqGold をポリメラーゼとして、95°C 12 分の後、「96°C 20 秒、50°C 20 秒、72°C 45 秒」×5 サイクル、次いで「96°C 20 秒、60°C 20 秒、72°C 45 秒」×35 サイクル、次いで 72°C 3 分の低ストリンジェンシーの条件で PCR をおこなった。

その結果得られた RT-PCR 産物をゲルろ過後、塩基配列を決定したところ、トリプシンファミリーセリンプロテアーゼをコードする遺伝子断片であることが判

明した。この遺伝子断片をアミノ酸に翻訳するとそのアミノ酸配列には「Trypsin-His」のモチーフが含まれていた。この遺伝子断片の塩基配列のデータベースサーチをおこなったところ、ヒト EST (AA781356、aj25c04.s1 Soares - testis - NHT Homo sapiens cDNA clone 1391334 3', mRNA sequence.)と一部重なり合うことが判明した。この EST をアミノ酸に翻訳すると「Trypsin-Ser」モチーフが存在した。そこで得られた遺伝子断片の塩基配列を基に、5' RACE 用プライマーとして hPRO3-B (配列番号 : 3 8 / 5' GGA AAC AGC TCC TCG GAA TAT AAG C 3') および hPRO3-D (配列番号 : 3 9 / 5' TGG ATG GGC TAG TTA AGT CGT TGG T 3') を、3' RACE 用プライマーとして hPRO3-A (配列番号 : 4 0 / 5' TTC GAG GGA AGA ACT CGG TAT TC 3') および hPRO3-C (配列番号 : 4 1 / 5' TGT GAA AAC GGA TCT GAT GAA AGC G 3') を作製し、human testis Marathon ready cDNA (CLONTECH 社) をテンプレートとして、添付のマニュアルの方法に従い nested RACE を実施し、全長 cDNA のクローニングをおこなった。RACE 産物を直接または pGEM T easy vector にサブクローニングしてその塩基配列を決定した。その塩基配列を配列番号 : 9 に、アミノ酸配列を配列番号 : 1 0 に示す。

この新規ヒト遺伝子は、マウス「Tespec PRO-1」の塩基配列より合成したプライマーを用いて得られたにもかかわらず、マウス「Tespec PRO-1」よりもデータベース中のマウス精巣 (mouse testis) EST (AA497965、AA497934、AA497919 等) に、より相同性が高かった (図 1 4)。そこで、この遺伝子をヒト「Tespec PRO-3」と名付けた。

ヒト「Tespec PRO-3」の cDNA は 1123 塩基で、352 アミノ酸をコードしていると予想される (図 1 3)。N 末端にはシグナルペプチドと思われる配列が存在し、「Trypsin His」及び「Trypsin-Ser」モチーフを有していた。また分子内ジスルフィド結合をしていると思われる Cys 残基も他のセリンプロテアーゼと比較してよく保存されていた。

[実施例 1 0] マウス「Tespec PRO-3」遺伝子の全長 cDNA クローニング

上述したヒト「Tespec PR0-3」のマウスカウンターパートであるマウス「Tespec PR0-3」は、上述の数個のマウス精巣 EST の塩基配列を含む遺伝子であると思われる。この遺伝子のマウス EST は合計 8 つデータベースに登録されており、4 つは精巣由来、1 つは腎臓由来、残りの 3 つは組織不明の cDNA 由来であった。そこでこれらの EST からプライマーを作成し、mouse testis Marathon ready cDNA をテンプレートとした RACE をおこない、マウス「Tespec PR0-3」の全長 cDNA 配列のクローニングをおこなった。

マウス EST (AA497965, AA497934, AA497919, AA497949, AA271404, AA238183, AA240375, AA105229) の塩基配列を基に、5' RACE 用プライマーとして mPRO3-B (配列番号 : 4 2 / 5' CAC CTA CTG CCA GGA TCT GTG G 3') 及び mPRO3-D (配列番号 : 4 3 / 5' GGC TAT TTT CTC AAT CCA CAG GGT A 3') を、3' RACE 用プライマーとして mPRO3-A (配列番号 : 4 4 / 5' ATA GAG TGG GAG GAA TGC TTA CAG A 3') 及び mPRO3-C (配列番号 : 4 5 / 5' GCT ACG ATG CTT GCC AGG GTG 3') を作成し、mouse testis Marathon ready cDNA (CLONTECH) をテンプレートとして、添付マニュアルの方法に従い nested RACE を実施した。RACE 産物を直接または pGEM T easy vector にサブクローニングしてその塩基配列を決定した。その塩基配列を配列番号 : 7 に、アミノ酸配列を配列番号 : 8 に示す。

得られたマウス「Tespec PR0-3」の cDNA は 1028 塩基で、321 アミノ酸をコードしていると思われる (図 15)。予想されるアミノ酸配列は、「Trypsin-Ser」モチーフは持つが「Trypsin His」モチーフは 6 アミノ酸のコンセンサス [ LIVM ] - [ ST ] - A - [ STAG ] - H - C から 1 アミノ酸異なる (LTVAHC)。しかしマウス「Tespec PR0-2」同様、既知のトリプシンファミリーセリンプロテアーゼにおいても、コンセンサス配列から数アミノ酸異なった配列を持つものも存在するため、得られたマウス「Tespec PR0-3」もプロテアーゼとして機能するものと考えられる。また、N 末端にはシグナルペプチドと思われる疎水性領域が存在し、また分子内ジスルフィド結合をしていると思われる Cys 残基も他のセリンプロテアーゼ

と比較してよく保存されていた。

ヒト及びマウス「Tespec PR0-3」は、核酸及びアミノ酸レベルでそれぞれ 70.2%、および 59.6%の相同性を持つ（図 16、17）。ヒト「Tespec PR0-3」に比べてマウス「Tespec PR0-3」は、核酸レベルにおいて 5' 側が約 100 塩基短く、またアミノ酸レベルにおいても N 末端側が約 30 アミノ酸短いことが判明した。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規トリプシンファミリーセリンプロテアーゼおよびその遺伝子が提供された。本発明のタンパク質は、精子の分化・熟成または精子の機能（受精）に関与していることを示唆される。したがって、本発明のプロテアーゼやその遺伝子は、新しい不妊症の治療薬や不妊症診断薬の開発、あるいは新しい避妊薬の開発への利用が期待される。

## 請求の範囲

1. 配列番号：2、4、6、8、10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
2. 配列番号：2、4、6、8、10のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等な、下記（a）または（b）に記載のタンパク質。
  - （a）配列番号：2、4、6、8、10のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなるタンパク質。
  - （b）配列番号：1、3、5、7、9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質。
3. 請求項1または2に記載のタンパク質の部分ペプチド。
4. 請求項1または2に記載のタンパク質と他のペプチドとからなる融合タンパク質。
5. 請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。
6. 請求項5に記載のDNAが挿入されたベクター。
7. 請求項5に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。
8. 請求項7に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。
9. 請求項1または2に記載のタンパク質の基質をスクリーニングする方法であって、
  - （a）該タンパク質に被検試料を接触させる工程、
  - （b）該タンパク質の被検試料に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および
  - （c）該プロテアーゼ活性により分解または切断を受ける化合物を選択する工程、



を含む方法。

10. 請求項9に記載の方法により単離されうる、請求項1または2に記載のタンパク質の基質。

11. 請求項1または2に記載のタンパク質の活性を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該タンパク質に請求項10に記載の基質を接触させる工程、

(b) 該タンパク質による該基質に対するプロテアーゼ活性を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該プロテアーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

12. 請求項11に記載の方法により単離されうる、請求項1または2に記載のタンパク質の活性を阻害する化合物。

13. 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する抗体。

14. 請求項13に記載の抗体と、請求項1または2に記載のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる、該タンパク質を検出又は測定する方法。

15. 配列番号：1、3、5、7または9のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するヌクレオチド。



1 / 17

☒ 1

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
CCTGCCTCAAGTGTGGAGCTCCCATCTGCTGATGTGCAGGCAAGCCGATGAAACGATGGAAGGACAGAAACAGGCTGTTGCTGCCAT  
M K R W K D R R T G L L L P L

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
TGGTCTCCTGTTGTTGGGGCATGTAGCTCACTGGCATGGGTATGTGGCCGGGAATGAGTAGCAGATCCCAACAACCTTAACAATGCTT  
V L L L F G A C S S L A W V C G R R M S S R S Q Q L N N A S

190 200 210 220 230 240 250 260 270  
CTGCTATCGTGGAAAGGCAACCTGCTTCTGCTATCGTGGGAGGCAACCTGCAAAACATCTTGGAGTTCCCTGGCATGTGGGGATTATGA  
A I V E G K P A S A I V G G K P A N I L E F P W H V G I M N

280 290 300 310 320 330 340 350 360  
ATCATGGTAGTCATCTCTGTGGGGGATCTATTCTCAATGAGTGGTGGGTCTATCTGCATCCCATTTGCTTGACCAACTAAACAACCTTA  
H G S H L C G G S I L N E W W V L S A S H C F D Q L N N S K

370 380 390 400 410 420 430 440 450  
AATTGGAGATCATTCATGGCACTGAAGACCTCAGCACAAAGGGCATAAAGTATCAGAAAGTGGACAAGTTATTCTTGACCCAAAGTTTG  
L E I I H G T E D L S T K G I K Y Q K V D K L F L H P K F D

460 470 480 490 500 510 520 530 540  
ATGACTGGCTCCTGGACAACGACATAGCTTTGCTCTTGTCTCAAAATCCCATTAACCTTGAGTGTCAACAGGATACCTATCTGCACTTCAG  
D W L L D N D I A L L L L K S P L N L S V N R I P I C T S E

550 560 570 580 590 600 610 620 630  
AAATCTCTGACATACAGGATGGAGGAAGTCTGGGTGACAGGATGGGGCATTACTAATACTAGTAAAAAGGAGTCCAACCCACAATTC  
I S D I Q A W R N C W V T G W G I T N T S E K G V Q P T I L

640 650 660 670 680 690 700 710 720  
TGCAGGCAGTCAAAAGTGGATCTGTACAGATGGGATTGGTGTGGCTATATTTGTCTCTATTAACCAAGAAATATGCTGTGTGCTGGGACTC  
Q A V K V D L Y R W D W C G Y I L S L L T K N M L C A G T Q

730 740 750 760 770 780 790 800 810  
AAGATCCTGGGAAGGATGCTGCTGAGGGGACAGTGGAGGAGCTCTCGTTTGAACAAAAAGAGAAACACAGCCATTTGGTACCAAGGTGG  
D P G K D A C Q G D S G G A L V C N K K R N T A I W Y Q V G

820 830 840 850 860 870 880 890 900  
GCATTGTAGCTGGGGCATGGGCTGTGGCAAGAAGAATCTGCCAGGAGTATACCAAGGTGTACACTATGTGAGGTGGATCAGCAAGC  
I V S W G M G C G K K N L P G V Y T K V S H Y V R W I S K Q

910 920 930 940 950 960 970 980 990  
AGACAGCGAAGGCGGGGAGGCTTATATGTATGAGCAGAACTCTGCGTGGCCTTTGGTGTCTCTTGGCGGGCTATCTTGTCTTATATT  
T A K A G R P Y M Y E Q N S A C P L V L S C R A I L F L Y F

1000 1010 1020 1030 1040  
TTGTAATGTTTCTTCTAACCTGATGATTAACGAGAGCTGCC  
V M F L L T \*







3 / 17

3

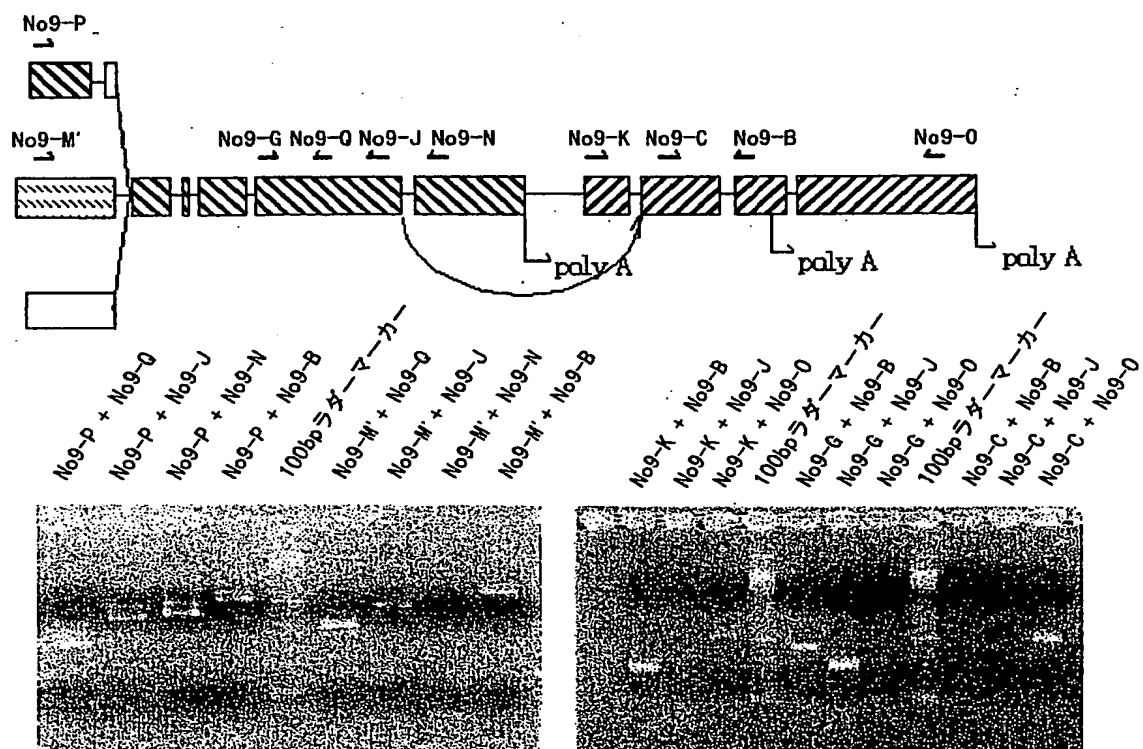
Tespec PRO-1 pep	MKRWKDRRTG	LLLPLVLLF	GACSSLAWVC	GRRMSSRSQQ	LNNASAVEG	KPASAIVGGK	60		
Tespec PRO-2 pep	M—MLP	LLIALLMASK	GQAKDQ—	ESVLCGHRPA	FPNSSWL—	—PLRELLEVO	47		
h. prostasin	MAQKGVLP	QLGAVAILLY	LGLLRSG—T	GAEGAEAPCG	V—APQA—	—RITGSSAV	52		
m. acrosin prec	MVEM—	—LPTVAVLV—	LAVSVVA—K	DNTTCGPGC	LRFRQNSQAG	TRIVSGQSAQ	50		
m. trypsin prec	MS—	—ALLI—	LALVGAA—V	AFPVDDDD—	—	—KIVGGYTCR	31		
	*	..	.	.	.	.			
Tespec PRO-1 pep	PANILEFPWH	VGIMNHGS—	—HLCGGS	ILNEWV	LSA SHCFDQ—	—LNNSKL	106		
Tespec PRO-2 pep	HG—EFPWQ	VSIQMLGK—	—HLCGGS	IIHRWV	LTA AHCFPR—	—TLLELVAVNV	94		
h. prostasin	AG—QWPWQ	VS I—TYEG—	—VHVCSS	LVSEQWV	LSA AHCFPSEHHK	EAYEVKLGAAH	103		
m. acrosin prec	LG—AWPWH	VSLQIFTSHN	SRRYHACGGS	LLNSHWV	LTA AHCFDNKKKV	YDWRLVFGAQ	107		
m. trypsin prec	ES—SVPYQ	VSL—NAG—	—YHFCGGS	LINDGWV	VSA AHCFKYRIQ—	—VRLGEH	76		
	. . *	*..	* **	... *	*** .	***			
Tespec PRO-1 pep	EIIHGTECLS	TKGIKYQKVD	KLFLHPKFDD	WLLDN	DIAL	LLKSPLNLSV	NRPICTSE—	165	
Tespec PRO-2 pep	TVVMGIKTF	DTNLERKQVQ	KIIAHRDYK	PDLD	DLCL	LLATPIQFNK	DKMPICLPQ—	153	
h. prostasin	QLD—SY	SEDAKVSTLK	DIIPHSYLO	EGSQG	DIAL	QLSRPI TFSR	YIRPICLPA—	158	
m. acrosin prec	EIEYGRNKP	KEPQERYVQ	KIVIEKYNV	VTEGN	DIAL	KITPPVTGCG	FIGPCCLPHF	167	
m. trypsin prec	NIN—VL	EGNEQFVDSA	KIIRHPNYS	WTLDN	DIMLI	KLASPVTLNA	RVASVPLP—	129	
	..		.. *	.. *	.. *	.. *			
Tespec PRO-1 pep	ISDIQAWRN—	CWVTGWGITN	TSEKGVQPTI	—LQAVKVDLY	RWDWCG—Y	ILSL—	214		
Tespec PRO-2 pep	REN—SWDR—	CWSEWAYTH	GHGSAGKSNM	HLKKLRVVQI	SWRTCA—K	RVTO—	201		
h. prostasin	NASFPNGLH—	CTVTGWGHVA	PSVLLTPK	—LQGLEVPLI	SRETNCNLYN	IDAKPEEPHF	216		
m. acrosin prec	KAGPPQIPHT	CYVTGWGYIK	EKAPRSP—V	—LMEARVDLI	DLDLCNSTOW	YNGR—	219		
m. trypsin prec	SSCAPAGTQ—	CLISGWGNTL	SN—GVNNPDL	—LQCVDAVL	POADCEA—S	YPGD—	178		
	. . .	* . . . *	.	*	.	..			
Tespec PRO-1 pep	LTKNMLCAGT	QDPGK	DACGG	DSCGALV	CNK	KRNTAIWYQV	GIVSWGMC	KKNLPGVYTK	274
Tespec PRO-2 pep	LSRNMLCAWK	EVGTN	GKCGG	DSCGAPV	CA—	NWETRRLFOV	GVFSWGITS	SRGRPGIFVS	260
h. prostasin	VQEDMVCAGY	VEGGK	DACGG	DSCGGLS	CPV	E—G—LWYLT	GIVSWGDCG	ARNRPGVYTL	273
m. acrosin prec	VTSTNVGAGY	PEGKI	DTCCG	DSCGGLM	CRD	NVDS—PFVVV	GITSWVGCA	RAKRPGVYTA	278
m. trypsin prec	ITNNMICVGF	LEGGK	DSCGG	DSCGPPV	CNG	ELQG—I—	—VSWGYGCA	QPDAPGVYTK	231
	.. . . *	.	***	***	..	..	***	..	****
Tespec PRO-1 pep	VSHYVRWISK	QT—	—	AKAGRPMYE	ONSACPLVLS	C—R—	—	—	308
Tespec PRO-2 pep	VAQFIPWILE	ET—	—	QREGALALS	KASKSLLAGS	P—RYH—	—	—	296
h. prostasin	ASSYASWIQS	KVT—ELQ	—	PRVVPQTQES	—QPSNLGGS	HLA—FSS	—	—	320
m. acrosin prec	TWDYLDWIAS	KIGPNALHLI	—	QPATPHPTT	RHPMVSFHPP	SLRPPWYFQH	—	—	338
m. trypsin prec	VCNYVDWION	TI—	—	—	—	—	—	—	243
	.. . *	..							
Tespec PRO-1 pep	—AIL—	—FLYF—	—	—	—	—VMFL—	—LT—	—	321
Tespec PRO-2 pep	—PIL—	—LSMG—	—	—	—	—SQIL—	—LAAIF—	—	312
h. prostasin	LRPIL—	—FLPL—	—	—	—	—GLALG—	—LL—	—	336
m. acrosin prec	LRPLLHRPSS	TOTSSSLMPL	—	LSPPTPAQPA	SFTIATQHMR	HRTTLSFARR	—	LQRLIEALKM	398
m. trypsin prec	—	—	—	—	—	—	—	—	243
Tespec PRO-1 pep	—	—	—	—	—	—	—	—	321
Tespec PRO-2 pep	—	—	—	—	—	—SDDKSNC	—	—	319
h. prostasin	—	—SPW—	—	—	—LSEH—	—	—	—	343
m. acrosin prec	RTYPMKHPSQ	YSGPRNYHYR	—	FSTFEPLSNK	—	PSEPLHS	—	—	436
m. trypsin prec	—	—	—	—	—ADN—	—	—	—	246





4 / 17

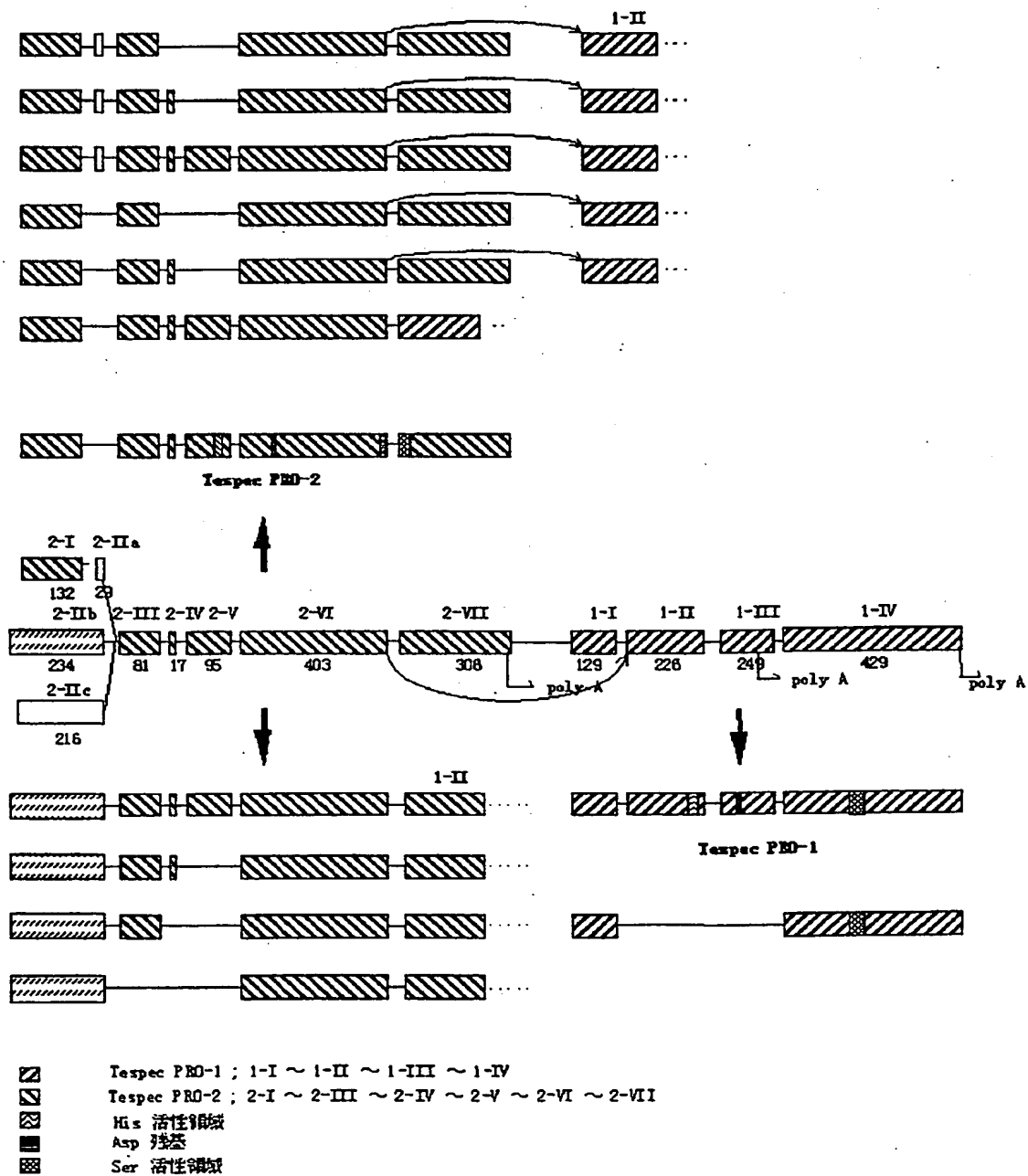
図 4





5/17

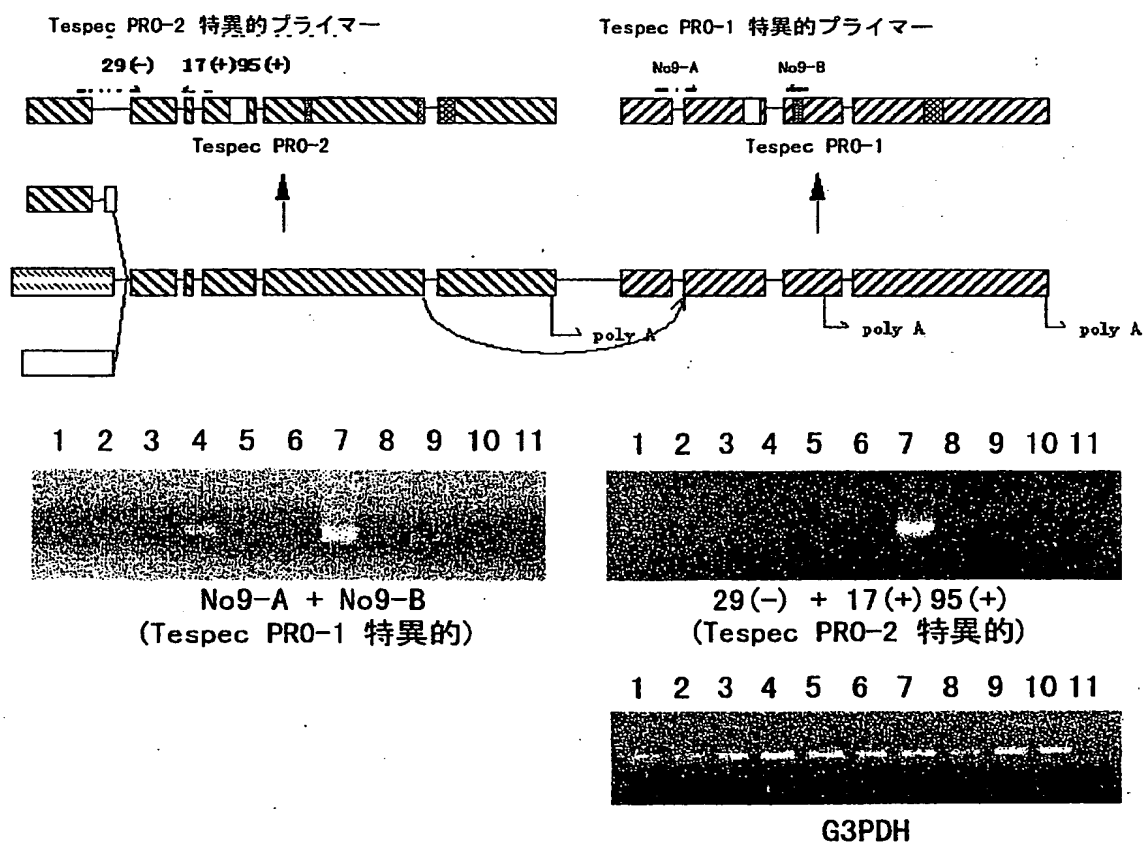
図 5





6 / 17

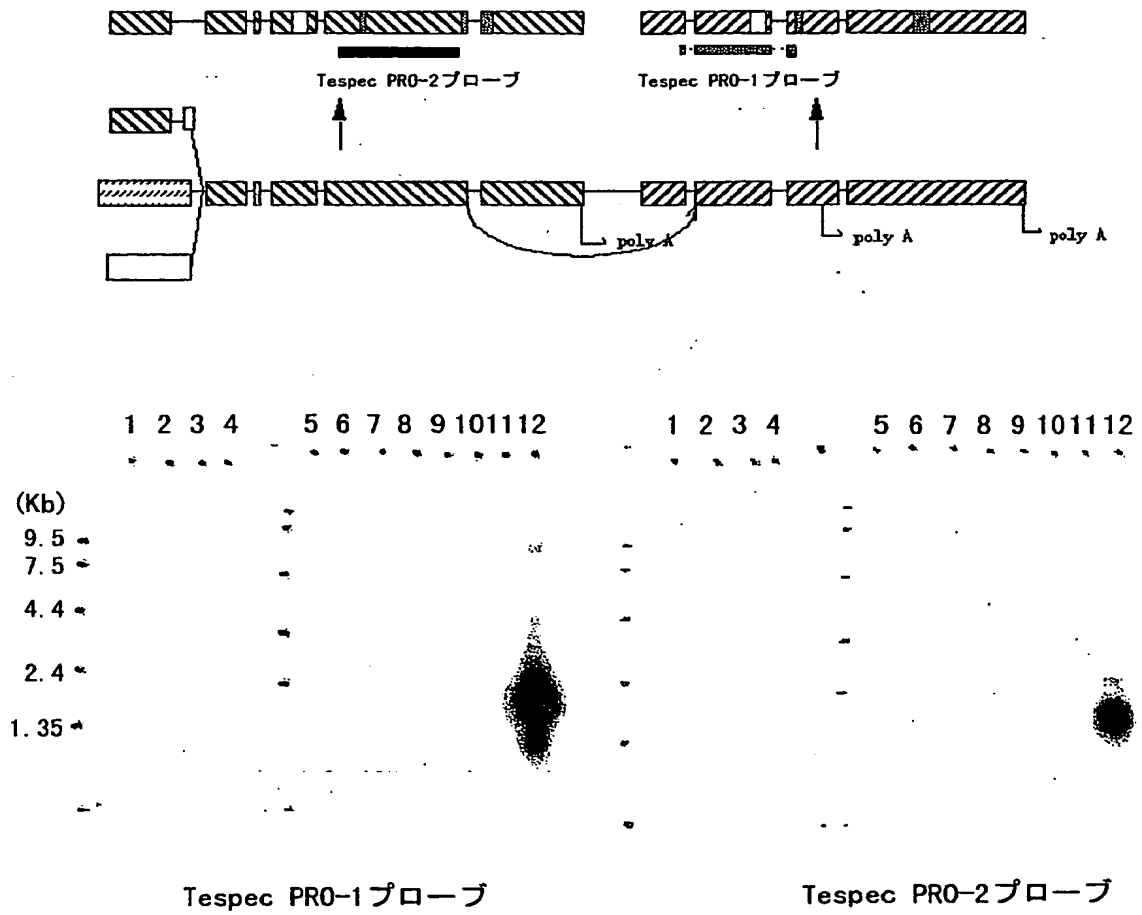
図 6





7 / 17

図 7

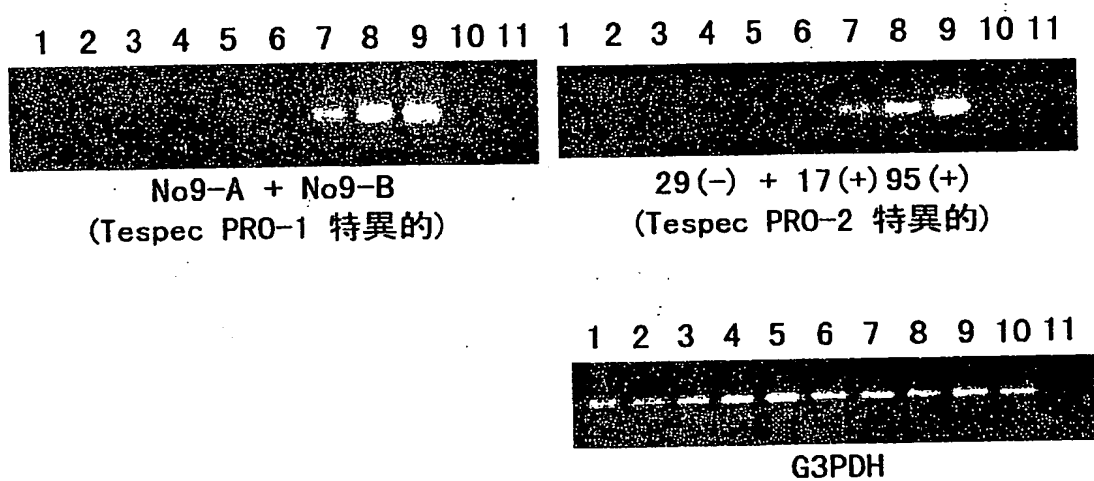






8/17

図 8





9 / 17

☒ 9

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
CTGTGGCTGGCATGTTGTCAAGCTCTGGCTGGAGGGCAAGGTTTGGCAATTTTGGACTGGAAATTGACAAGAAGATGTTCCAGCTTCTAATT  
M F Q L L I

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
CCCCTGCTTTTGGCACTCAAGGGACATGCCCAAGGACAATCCAGAAAACGTACAATGTGGCCACAGGCCTGCTTTTCCAAACTCGTCATGG  
P L L L A L K G H A Q D N P E N V Q C G H R P A F P N S S W

190 200 210 220 230 240 250 260 270  
TTACCATTTTCATGAACGGGCTTCAAGTCCAGAATGGTGAAGTGGCCGTGGCAAGTGAATATCCAGATGTCACGGAAACACCTCTGTGGAGGGC  
L P F H E R L Q V Q N G E C P W Q V S I Q M S R K H L C G G

280 290 300 310 320 330 340 350 360  
TCAATCTTACATTGGTGGTGGGTTCTGACAGCCGACACTGCTTCCGAAGAACCCTATTAGACATGGCCGTGGTAAATGTCAGTGTGGTC  
S I L H W W W V L T A A H C F R R T L L D M A V V N V T V V

370 380 390 400 410 420 430 440 450  
ATGGGAACGAGAACATTGAGCAACATCCACTCGGAGAGAAAGCAAGTGCAGAAAGGTCATTATTCACAAAGATTACAAACCGCCCCAGCTC  
M G T R T F S N I H S E R K Q V Q K V I I H K D Y K P P Q L

460 470 480 490 500 510 520 530 540  
GACAGTGACCTCTCTCTGCTTCTACTTGCACACCAAGTGAATTCAGCAATTTCAAATGCTGTCTGCTGACAGGAGGAGGAGAGGACC  
D S D L S L L L L A T P V Q F S N F K M P V C L Q E E E R T

550 560 570 580 590 600 610 620 630  
TGGGACTGGTGTGGATGGCAGAGTGGGTAACGACCAATGGGTATGACCAATATGATGACTTAAACATGCACCTGGAAAAGCTGAGAGTG  
W D W C W M A Q W V T T N G Y D Q Y D D L N M H L E K L R V

640 650 660 670 680 690 700 710 720  
GTGCAGATTAGCCGGAAAGAATGTGCCAAGAGGGTAAACCAAGCTGTCCAGGAACATGATTTGTGCTTGAACGAACAGGACCAATGGT  
V Q I S R K E C A K R V N Q L S R N M I C A S N E P G T N G

730 740 750 760 770 780 790 800 810  
ATCTTCAAGGGAGACAGTGGGGCACCTCTGGTTTGTGCTATTTATGGAACCCAGAGACTCTTCCAAGTGGGTGTCTTCAGTGGGGGCATA  
I F K G D S G A P L V C A I Y G T Q R L F Q V G V F S G G I

820 830 840 850 860 870 880 890 900  
AGATCTGGCTCCAGGGGGAGACCTGGTATGTTGTGTGTGTGGCTCAATTTATTCCATGAAGCCAGGAGGAGACAGAAAAGGAGGGGAAA  
R S G S R G R P G M F V S V A Q F I P \*

910 920 930 940 950 960 970 980 990  
GCCTACACCAATAATCTCAGGATCCACGAGAAGCCGAGAAGCTCACTGGTGTGTGTCTCTCAATACCCCTTCTTGTAGGATTGGGGTCTC

1000 1010 1020 1030  
AAATGCTGCTGGCCACCATGTTTACGGGTGATAAACCTAACYRCW



10/17

☒ 10

h. Tespec FRO-2	— CTTTGGC TGGCTTTTG TCACTCTGG GGGAGGCA AGGTTGGCA ATTITGGCT	57
m. TespecFRO-2	CCCACTTIN GGT-TT-NA TCACTCTGG GGGAGGCA AGG-TGGCA CCACITGGCT	57
h. Tespec FRO-2	GGATGACA AATGATGTT CCACTCTCA ATTCCTGC TTITGGCT CAAGGACT	117
m. TespecFRO-2	GGATGACA AATGATGTT CCACTCTCA ATTCCTGC TCAITGGCT CAAGGACA	116
h. Tespec FRO-2	GCTAGGCA ATTCAGAAA GGTGATGT GGCACAGC CTGCTTCC AACTCTCA	177
m. TespecFRO-2	GCTAGGAC ATTCAGATC AGTGTGTGT GGCACAGC CTGCTTCC AACTCTCA	176
h. Tespec FRO-2	TGCTACAT TTTAGGAG GCTTCTGTC CAGATGGTG AGTGGCTG GCAAGTGT	237
m. TespecFRO-2	TGCTACAT TTTAGGAG GCTTCTGTC CAGATGGTG AGTGGCTG GCAAGTGT	236
h. Tespec FRO-2	ATTCAGAT CAGGGAACA CTTTGGGA GCTCTATCT TACTTGGTG GTGGTCTC	297
m. TespecFRO-2	ATTCAGAT TTTGGAACA CTTTGGGA GCTCTATCT TACTTGGTG GTGGTCTC	296
h. Tespec FRO-2	ACAGGCTC ACTGCTTCC AGAAGCTA TTAGCTAG CTTTGGTA TGTACTGT	357
m. TespecFRO-2	ACAGGCTC ACTGCTTCC AGAAGCTA TTAGCTAG TTTCTGTA TGTACTGT	356
h. Tespec FRO-2	GTCTGGGA CAGGATTT CAGTACAC CACTGAGA GAATCAGT GCAGAGCT	417
m. TespecFRO-2	GTCTGGGA TTAGATTT CAGTACAC CACTGAGA GAATCAGT GCAGAGCT	416
h. Tespec FRO-2	ATTACTCA AAGTCTCA AAGGCTG CAGCAGG AACTCTCT GCTTACTT	477
m. TespecFRO-2	ATTACTCA AAGTCTCA AAGGCTG CAGCAGG AACTCTCT GCTTACTT	476
h. Tespec FRO-2	GGCACTG TCAATTG GATTTCAA ATGCTTCT GCTGCTCA GAGGAGG	537
m. TespecFRO-2	GGCACTCA TCAATTCA TATGCTAA ATGCTTCT GCTGCTCA GAGGAGG	536
h. Tespec FRO-2	ACCTGGAT GGTCTGGT GCTAGTGG CTTACCTA ATGCTTCT CTTTCTCT	597
m. TespecFRO-2	TCTGGAT GGTCTGGT GCTAGTGG CTTTCTCT ATGCTTCT TTTTCTCT	596
h. Tespec FRO-2	GCTTAAAC TGCCTTCA AAGCTTCA GGTCTAGA TTGGCTGA AGTATGCT	657
m. TespecFRO-2	GCTTAAAC TGCCTTCA AAGCTTCA GGTCTAGA TTGGCTGA AGTATGCT	656
h. Tespec FRO-2	AGGAGGTA AAGCTTCT CAGGATCT ATTITGCTT GAGGATC AGGACAT	717
m. TespecFRO-2	AGGAGGTA AAGCTTCT CAGGATCT ATTITGCTT GAGGATC AGGACAT	716
h. Tespec FRO-2	GCTTCTCA AGGAGACG TGGGCTCT CTTTGGTG CTTTCTCT AGGAGAG	777
m. TespecFRO-2	GCTTCTCA AGGAGACG TGGGCTCT CTTTGGTG CTTTCTCT AGGAGAG	776
h. Tespec FRO-2	CCTTCTAG TGGTGTCT CAGTGGGC ATAGCTG GCTTCTAG GAGGAGG	837
m. TespecFRO-2	CCTTCTAG TGGTGTCT CAGTGGGC ATAGCTG GCTTCTAG GAGGAGG	836
h. Tespec FRO-2	ATTITGCT CTTTGGCT ATTATCTA TTTTCTAG AGGAGATC AAGGAGG	897
m. TespecFRO-2	ATTITGCT CTTTGGCT ATTATCTA TTTTCTAG AGGAGATC AAGGAGG	896
h. Tespec FRO-2	AAGCTTCA CTTTCTCT AAGGATCT AAGGATCT AAGGATCT CTTTCTCT	957
m. TespecFRO-2	CCTTCTCT CTTTCTCT AAGGATCT AAGGATCT AAGGATCT CTTTCTCT	948
h. Tespec FRO-2	CCTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT	1017
m. TespecFRO-2	CCTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT	1008
h. Tespec FRO-2	GCTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT	1035
m. TespecFRO-2	GCTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT CTTTCTCT	1034



11/17

☒ 11

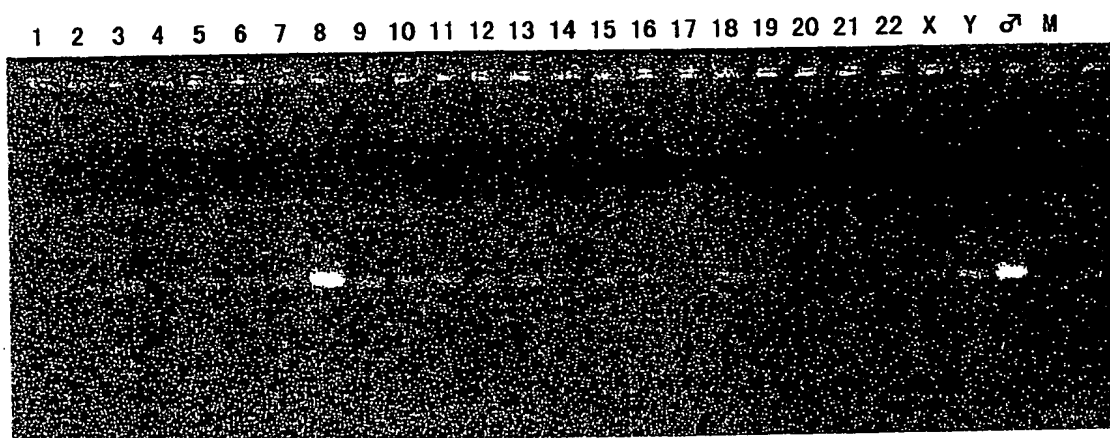
h. Tespec PRO-2 pep	MFQLLIPLLL AL---KGHA QDNPENVCQG HRPAPNSSW LPFHERLOVO NGECPWQVSI	56
m. Tespec PRO-2 pep	M---MLPLL ALLMASKGQA KQQESVLCG HRPAPNSSW LPLRELLEVO HGEFPWQVSI	57
	*    **    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *	
h. Tespec PRO-2 pep	QMSRKHLCCG SILHWWMLT AAHCFRRTLL DMAVNVTVV MGTRTFSNIH SERKQVQKVI	116
m. Tespec PRO-2 pep	QMLGKHLCCG SIIHRWWLT AAHCFRRTLL ELVAVNVTVV MGIKTFSDTN LERKQVQKII	117
	**    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *	
h. Tespec PRO-2 pep	IHKDYKPPQL DSDLSLLLL TPVQFSNFKM PVCLQEEERT WDWCHMAQWV TTNGYDQYDD	176
m. Tespec PRO-2 pep	AHRDYKPPDL DSDLCLLLL TPIQFNKDKM PICLPQRENS WDRCHMSEWA YTHGHGSAKG	177
	*    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *	
h. Tespec PRO-2 pep	LNMHLEKLRV VOISRKECAK RVNQLSRNMI CASNEPGTNG IFKGDGAPL VCAIYGTQRL	236
m. Tespec PRO-2 pep	SNMHLKLRV VOISWRTCAK RVTQLSRNML CAWKEVGTNG KCGDGSAPW VCANNETRRL	237
	***    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *    *	
h. Tespec PRO-2 pep	FQVGVFSGGI RSGSRGRPGM FVSAQFIP- _____	265
m. Tespec PRO-2 pep	FQVGVFSGGI TSGSRGRPGI FVSAQFIPW ILEETQREGR ALALSKASKS LLAGSPRYHP	267
	*****    *    *****    *****	
h. Tespec PRO-2 pep	_____	285
m. Tespec PRO-2 pep	ILLSMGSQIL LAAIFSDDKS NC	319





12/17

☒ 12





13/17

☒ 13

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
GGCCTCTGTCAACCCCGGGCCACAGCACAGCCAGGGCCATGCTCTGTTCTCAGTGTGCTGCTCCTGTCCCTGGTCACGGGAACCTCA  
M L L F S V L L L L S L V T G T Q

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
GCTCGGTCCACGGACTCCTCTCCAGAGGCTGGAGTGCTATCTAGGCAGGGCTAGGGGAAGCCACCGCCCTCAGCCCGTCATCCCC  
L G P R T P L P E A G V A I L G R A R G A H R P Q P R H P P

190 200 210 220 230 240 250 260 270  
CAGCCAGTCAGTGAATGTGGTGACAGATCTATTTTCAGGGGAAGAAGTCTGGTATTCAGAATCACAGGGGGGATGGAGCGGAGGTGGG  
S P V S E C G D R S I F E G R T R Y S R I T G G M E A E V G

280 290 300 310 320 330 340 350 360  
TGAGTTTCCGTGGCAGGTGAGTATTCAGGCAAGAAGTGAACCTTCTGTGGGGCTCCATCCTCAACAAGTGGTGGATTCTCACTGCGGC  
E F P W Q V S I Q A R S E P F C G G S I L N K W W I L T A A

370 380 390 400 410 420 430 440 450  
TCACTGCTTATATTCGAGGAGCTGTTTCCAGAAGAAGTGAAGTGTGCTGCTGGGGACCAAGCACTTAAGTAGCCCATCCATGGAAATAAA  
H C L Y S E E L F P E E L S V V L G T N D L T S P S M E I K

460 470 480 490 500 510 520 530 540  
GGAGGTGCGCAGCATATTCTTCAAAAGACTTTAAGAGAGCCAAACATGGACAATGACATTGCCTTGTCTGCTGGCTCGCCCATCAA  
E V A S I I L H K D F K R A N M D N D I A L L L L A S P I K

550 560 570 580 590 600 610 620 630  
GCTCGATGACCTGAAGGTGCCCCTGCTCCCGCAGCAGCCCGCCCTGCCACATGGCGCAATGCTGGGTGGCAGGTTGGGGCCAGAC  
L D D L K V P I C L P T Q P G P A T W R E C W V A G W G Q T

640 650 660 670 680 690 700 710 720  
CAATGCTGCTGACAAAACTCTGTGAAAACGGATCTGATGAAAGGCCCAATGGTCATCATGGAAGTGGGAGGAGTGTTCAAAGATGTTTCC  
N A A D K N S V K T D L M K A P M V I M D W E E C S K M F P

730 740 750 760 770 780 790 800 810  
AAAACCTACCAAAATATGCTGTGTGCGGATACAAGAATGAGAGCTATGATGCCTGCAAGGGTGACAGTGGGGGGCCTCTGGTCTGCAC  
K L T K N M L C A G Y K N E S Y D A C K G D S G G P L V C T

820 830 840 850 860 870 880 890 900  
CCCAGAGCCTGGTGAGAAGTGGTACCAGGTGGGCATCATCAGCTGGGGAAAGAGCTGTGGAGATAAGAACACCCAGGGATATACACCTC  
P E P G E K W Y Q V G I I S W G K S C G D K N T P G I Y T S

910 920 930 940 950 960 970 980 990  
GTTGGTGAACTACAACCTCTGGATCGAGAAAAGTGAACCCAGCTAGGAGGCGAGGCCCTTCAATGCAGAGAAAAGGAGGACTTCTGTCAAACA  
L V N Y N L W I E K V T Q L G G R P F N A E K R R T S V K Q

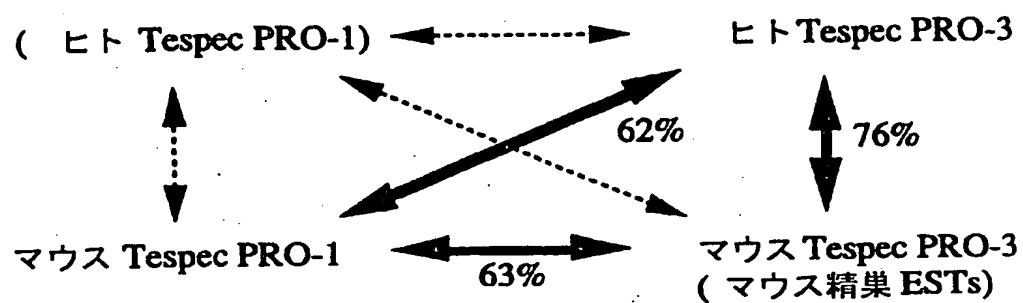
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GAAACCTATGGGCTCCCGAGTCTCGGGAGTCCCAGAGCCAGGCGCCAGATCCTGGCTCCTGCTGTGCCCTGTCCCATGTGTGTGTT  
K P M G S P V S G V P E P G S P R S W L L L C P L S H V L F

1090 1100 1110 1120 1130  
CAGAGCTATTTGTACTGATAATAAATAGAGGCTATTCTTTC  
R A I L Y \*



14/17

図 14





15/17

☒ 15

10 20 30 40 50 60 70 80 90  
GTCAGCCTGGCCTCCAACACACAGCACAGCCAGCCATGATCCTGCCCTCCATCCTGCTACTTGTGCCCACACCCTGGAAGCAAATGT  
M I L P S I L L L V A H T L E A N V

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
TGAGTGTGGTGTGAGACCCCTGTATGATAGCAGAATTCATACTCCAGGATCATAGAAGGGCAGGAGGCTGAGCTGGGTGAGTTTCCATG  
E C G V R P L Y D S R I Q Y S R I I E G Q E A E L G E F P W

190 200 210 220 230 240 250 260 270  
GCAGGTGAGCATTGAGGAAAGTGACCACCATTTCTGCGGCGGCTCCATTCTCAGTGAGTGGTGGATCCTCACCCTGGCCCACTGCTTCTA  
Q V S I Q E S D H H F C G G S I L S E W W I L T V A H C F Y

280 290 300 310 320 330 340 350 360  
TGCTCAGGAGCTTTCCCCAACAGATCTCAGAGTCAGAGTGGGAACCAATGACTTAAGTACTTCAACCCTGGAAGTAGAGGTGACCACCAT  
A Q E L S P T D L R V R V G T N D L T T S P V E L E V T T I

370 380 390 400 410 420 430 440 450  
AATCGGGCAGAAAGGCTTTAAACGGCTGAACATGGACAACGACATTGCTTGTGCTGCTAGCCAAAGCCTTGGCGTTCAATGAGCTGAC  
I R H K G F K R L N M D N D I A L L L L A K P L A F N E L T

460 470 480 490 500 510 520 530 540  
GGTGGCCATCTGCCTTCTCTCTGCCCCGCCCTCCAGCTGGGACGAATGCTGGGTGGCAGGATGGGGCGTAACCAACTCAACTGACAA  
V P I C L P L W P A P P S W H E C W V A G W G V T N S T D K

550 560 570 580 590 600 610 620 630  
GGAATCTATGTCAACGGATCTGATGAAGGTGCCCATGCGTATCATAGAGTGGGAGGAATGCTTACAGATGTTTCCAGCCTCACCACAAA  
E S M S T D L M K V P M R I I E W E E C L Q M F P S L T T N

640 650 660 670 680 690 700 710 720  
CATGCTGTGTGCCTCATATGGTAATGAGAGCTACGATGCTTGCCAGGGTGACAGTGGGGGACCGCTTGTCTGCACCACAGATCCTGGCAG  
M L C A S Y G N E S Y D A C Q G D S G G P L V C T T D P G S

730 740 750 760 770 780 790 800 810  
TAGGTGGTACCAGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCAAGAGCTGTGGAAGGCTTCCAGGGATATATACTGTATTGGCAAAGTATAC  
R W Y Q V G I I S W G K S C G K K G F P G I Y T V L A K Y T

820 830 840 850 860 870 880 890 900  
CCTGTGGATTGAGAAAATAGCCAGACAGAGGGGAAGCCCTGGATTTAGAGGTGAGAGCTCCTCTAACAAGAAGAAAAACAGACAGAA  
L W I E K I A Q T E G K P L D F R G Q S S S N K K K N R Q N

910 920 930 940 950 960 970 980 990  
CAATCAGCTCTCCAAATCCCGAGCCCTGAACTGCCCCAAAGCTGGCTGCTGCCCTGTCTGCTGTCTTTGCACTGCTTAGAGCCTTGTG  
N Q L S K S P A L N C P Q S W L L P C L L S F A L L R A L S

1000 1010 1020 1030  
CAACTGGAAATAAAACAATGCAGTCTCTGATCCACCCT  
N W K \*





16/17

16

m. Tespec PRO-3	GTCA GCC -T G-CCCTCA A-CCACAG CACAGCC AG GCCATGTC CTGCTCTCA	53
h. Tespec PRO-3	G---GCCCT GTCA CCCC GGCCACAG CACAGCC AG GCCATGTC CTGCTCTAG	56
m. Tespec PRO-3	TCCTGCTCT CTCTGCCA--CAC-----CCT-----GG	88
h. Tespec PRO-3	TGTTGCTCT CTCTCCCTG GTCA CCGGAA CTCAGCTCGG TCCACGGACT CCTCTCCAG	116
m. Tespec PRO-3	AAGC--AANT G-TT-----	90
h. Tespec PRO-3	AAGGTGGANT GGTATCCTA GGCAGGGCTA GGGGAGCCCA CCGCCCTCAG CCCCCTCATC	176
m. Tespec PRO-3	-----TGAG TGTGGTGA GACCTCTTA TGATAGAGA ATTCATATCT	134
h. Tespec PRO-3	CCCCCAGCCC AGTCAGTGA TGTGGTGA GACCTATTTT GGAGGAGA ATTCGATAT	236
m. Tespec PRO-3	CCAGATCAT AGAGGGCAG GAGGCTGAG TGGGTGAGTT TCC TGGCAG GTGAGATTG	194
h. Tespec PRO-3	CCAGATCAT AGGGGGATG GAGGCTGAG TGGGTGAGTT TCC TGGCAG GTGAGATTG	296
m. Tespec PRO-3	AGCAAGTGA CCACTTTTC TGGGGGCT CCATCTCAG TCA GTGGTGG ATCTCACG	254
h. Tespec PRO-3	AGCAAGTGA TCACTTTTC TGGGGGCT CCATCTCAG TCA GTGGTGG ATCTCACG	356
m. Tespec PRO-3	TGGCCACTG CTCTATCT CAGGAGCTTT CCAACAGA CTCTAGGTC AGAGTGGGA	314
h. Tespec PRO-3	TGGCCACTG CTCTATCT CAGGAGCTTT TCCACAGA CTCTAGGTC GTGTGGGA	416
m. Tespec PRO-3	CCAATGACTT AACTACTTCA TCTGGGAA TA--GAGGT CCAACATA ATCTGGCACA	371
h. Tespec PRO-3	CCAATGACTT AACTAGCCA TCTGGGAA TAAAGAGGT CCAACATC ATCTGGCACA	476
m. Tespec PRO-3	AAGCTTTAA AGGCTCAAC ATGGACAAG ACATTGCCTT GTTGTGCTA GCAAGCCCT	431
h. Tespec PRO-3	AAGCTTTAA GAGAGCAAC ATGGACAAG ACATTGCCTT GTTGTGCTG GCTGGCCA	536
m. Tespec PRO-3	TGGGGTCTA TGA CTGAG GTGCCATCT GCCTCTCT CTGGCCGC CCTCCACCT	491
h. Tespec PRO-3	TCAAGTCTA TGA CTGAG GTGCCATCT GCCTCTCT GAGCCGC CCTCCACAT	596
m. Tespec PRO-3	GGGCGAATG CTGGGTGGCA GGTGGGGC TAACCAATC ACTGACAAG GANTCTGTG	551
h. Tespec PRO-3	GGGCGAATG CTGGGTGGCA GGTGGGGC AACCACATC TCTGACAA AATCTGTG	656
m. Tespec PRO-3	CAACGGATCT GATGAAGG CCAATGCTA TCATGATG GGAGGATG TTAAGATGT	611
h. Tespec PRO-3	AAACGGATCT GATGAAGG CCAATGCTA TCATGATG GGAGGATG TTAAGATGT	716
m. Tespec PRO-3	TTCCAGGCT TACCAAAAC ATGCTGTGTG CCAATATGG TAATGAGAGC TATGATGCT	671
h. Tespec PRO-3	TTCCAGGCT TACCAAAAT ATGCTGTGTG CCAATATCA TAATGAGAGC TATGATGCT	776
m. Tespec PRO-3	GGGAGGTGA CAGTGGGGG CCACTGTCT GCACCCAGA TCTGGAGT AGTGGTACC	731
h. Tespec PRO-3	GGGAGGTGA CAGTGGGGG CCACTGTCT GCACCCAGA TCTGGAGT AGTGGTACC	836
m. Tespec PRO-3	AGGTGGGCAT CATCAGCTGG GGAAGAGCT GTGGAAATA AGGCTTCCA GGGATATAA	791
h. Tespec PRO-3	AGGTGGGCAT CATCAGCTGG GGAAGAGCT GTGGAAATA GAACCTCCA GGGATATAA	896
m. Tespec PRO-3	GTGATTGGG AAATATATC CTGTGGATTG AGAAATATC CCAGACAGG TGGAGCCCT	851
h. Tespec PRO-3	CTCCTTGGT GAATATATC CTGTGGATTG AGAAATATC CCAGTAGG AGGAGCCCT	955
m. Tespec PRO-3	TGGATTTT AG AGTCAAGAG CTCTCTAAC AAGAAATAA ACACACAG CAATCAGTCT	910
h. Tespec PRO-3	TTCATTTT AG AGTCAAGAG GATCTCTT AA--ATAA AA--ATATGGC TCCCTCAGTCT	1013
m. Tespec PRO-3	TCCAATCCCT TACCTGTGA CTGCCCCA AGCTGGCTCC TGGCTGTCT CTGTCTCTT	970
h. Tespec PRO-3	CGGCAATCCCT TACCTGTGA CTGCCCCA AGCTGGCTCC GCTGTGTCT CTGTCTCTT	1072
m. Tespec PRO-3	GCACTGTTA GAGCTTTTC CACTCGAA TAAATATG AGCTCTTA TACCCCT	1028
h. Tespec PRO-3	GTGTTTGA GAGCTTTTC GACTGTAA TAAATATG--GAGCT--ATCTTTT	1123



17/17

☒ 17

m. Tespec PRO-3	MIHSHLLIV -----A MIHLEAM-----ECGRPLYD	27
h. Tespec PRO-3	MIHSHLLIL SLVTGTQLGP MIHLEAM ILGRARGAHR PQPRHPPSPV ECGRPSIFE	60
m. Tespec PRO-3	SRIOYSRIIE QAEALGEFP WQVSIQESDH HFCGGSIIE MWILTMAHCF YACELSPDQ	87
h. Tespec PRO-3	QRIYSRITG QAEALGEFP WQVSIQARSE HFCGGSIINK MWILTMAHCF YACELSPDQ	120
m. Tespec PRO-3	HWVGTNDLT TSPVEL EMT TIIRHNGFKR LNMNDIALL LLAKPLAFNE LVPICLPW	146
h. Tespec PRO-3	SWVGTNDLT SPSMINEVA STIIRHNGFKR LNMNDIALL LLAKPLKDD LVPICLPQ	180
m. Tespec PRO-3	RAPPSWECW VAGWQMTNST DKESMTDLM KAPMTIDEWE ECLQMFPELT NMMLCARYGN	206
h. Tespec PRO-3	REAPPSWECW VAGWQMTNAA DKESMTDLM KAPMTIDEWE ECLQMFPELT NMMLCARYGN	240
m. Tespec PRO-3	ESYDAQGGDS GGPLVCTTUP GSRWYQVGII SWGKSCGKG FPGIYTLAK YLWIEKTAQ	266
h. Tespec PRO-3	ESYDAQGGDS GGPLVCTPEP GSRWYQVGII SWGKSCGKN FPGIYTLAK YLWIEKTAQ	300
m. Tespec PRO-3	TECHPLDFRG QSSSNKKRNR QNNQUSKSPA LNOPLSWLLP CLLSFALLRA LSNWK	321
h. Tespec PRO-3	LCHPLDFN-AE KRRTSVKQKP MGSPVSGVDE PGSPSWLL CLLSHVLRA ILY--	352



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> Trypsin family serine proteinases

<130> C2-006PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-313366

<151> 1998-11-04

<160> 45

<210> 1

<211> 1033

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (48)..(1010)



&lt;400&gt; 1

cctgcctcag tgttgagct cccattgct gatgtgcagg caagccg atg aaa cga 56

Met Lys Arg

1

tgg aag gac aga aga aca ggc ctg ttg ctg cca ttg gtc ctc ctg ttg 104

Trp Lys Asp Arg Arg Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu

5

10

15

ttt ggg gca tgt agc tca ctg gca tgg gta tgt ggc cgg cga atg agt 152

Phe Gly Ala Cys Ser Ser Leu Ala Trp Val Cys Gly Arg Arg Met Ser

20

25

30

35

agc aga tcc caa caa ctt aac aat gct tct gct atc gtg gaa ggc aaa 200

Ser Arg Ser Gln Gln Leu Asn Asn Ala Ser Ala Ile Val Glu Gly Lys

40

45

50

cct gct tct gct atc gtg gga ggc aaa cct gca aac atc ttg gag ttc 248

Pro Ala Ser Ala Ile Val Gly Gly Lys Pro Ala Asn Ile Leu Glu Phe

55

60

65

ccc tgg cat gtg ggg att atg aat cat ggt agt cat ctc tgt ggg gga 296

Pro Trp His Val Gly Ile Met Asn His Gly Ser His Leu Cys Gly Gly

70

75

80





tct att ctc aat gag tgg tgg gtt cta tct gca tcc cat tgc ttc gac 344  
Ser Ile Leu Asn Glu Trp Trp Val Leu Ser Ala Ser His Cys Phe Asp  
85 90 95

caa cta aac aac tct aaa ttg gag atc att cat ggc act gaa gac ctc 392  
Gln Leu Asn Asn Ser Lys Leu Glu Ile Ile His Gly Thr Glu Asp Leu  
100 105 110 115

agc aca aag ggc ata aag tat cag aaa gtg gac aag tta ttc ttg cac 440  
Ser Thr Lys Gly Ile Lys Tyr Gln Lys Val Asp Lys Leu Phe Leu His  
120 125 130

cca aag ttt gat gac tgg ctc ctg gac aac gac ata gct ttg ctc ttg 488  
Pro Lys Phe Asp Asp Trp Leu Leu Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu  
135 140 145

ctc aaa tcc cca tta aac ttg agt gtc aac agg ata cct atc tgc act 536  
Leu Lys Ser Pro Leu Asn Leu Ser Val Asn Arg Ile Pro Ile Cys Thr  
150 155 160

tca gaa atc tct gac ata cag gca tgg agg aac tgc tgg gtg aca gga 584  
Ser Glu Ile Ser Asp Ile Gln Ala Trp Arg Asn Cys Trp Val Thr Gly  
165 170 175

tgg ggc att act aat act agt gaa aaa gga gtc caa ccc aca att ctg 632  
Trp Gly Ile Thr Asn Thr Ser Glu Lys Gly Val Gln Pro Thr Ile Leu



180	185	190	195	
cag gca gtc aaa gtg gat ctg tac aga tgg gat tgg tgt ggc tat att				680
Gln Ala Val Lys Val Asp Leu Tyr Arg Trp Asp Trp Cys Gly Tyr Ile				
	200	205	210	
ttg tct cta tta acc aag aat atg ctg tgt gct ggg act caa gat cct				728
Leu Ser Leu Leu Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Thr Gln Asp Pro				
	215	220	225	
ggg aag gat gcc tgc cag ggc gac agt gga gga gct ctc gtt tgc aac				776
Gly Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Cys Asn				
	230	235	240	
aaa aag aga aac aca gcc att tgg tac cag gtg ggc att gtc agc tgg				824
Lys Lys Arg Asn Thr Ala Ile Trp Tyr Gln Val Gly Ile Val Ser Trp				
	245	250	255	
ggc atg ggc tgt ggc aag aag aat ctg cca gga gta tac acc aag gtg				872
Gly Met Gly Cys Gly Lys Lys Asn Leu Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val				
260	265	270	275	
tca cac tat gtg agg tgg atc agc aag cag aca gcg aag gcg ggg agg				920
Ser His Tyr Val Arg Trp Ile Ser Lys Gln Thr Ala Lys Ala Gly Arg				
	280	285	290	



cct tat atg tat gag cag aac tct gcg tgc cct ttg gtg ctc tct tgc 968  
Pro Tyr Met Tyr Glu Gln Asn Ser Ala Cys Pro Leu Val Leu Ser Cys  
295 300 305

cgg gct atc ttg ttc cta tat ttt gta atg ttt ctt cta acc tga 1013  
Arg Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Phe Val Met Phe Leu Leu Thr  
310 315 320

tgattaaacg tgagactgcc 1033

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Lys Arg

1

Trp Lys Asp Arg Arg Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu  
5 10 15

Phe Gly Ala Cys Ser Ser Leu Ala Trp Val Cys Gly Arg Arg Met Ser  
20 25 30 35

Ser Arg Ser Gln Gln Leu Asn Asn Ala Ser Ala Ile Val Glu Gly Lys



40

45

50

Pro Ala Ser Ala Ile Val Gly Gly Lys Pro Ala Asn Ile Leu Glu Phe

55

60

65

Pro Trp His Val Gly Ile Met Asn His Gly Ser His Leu Cys Gly Gly

70

75

80

Ser Ile Leu Asn Glu Trp Trp Val Leu Ser Ala Ser His Cys Phe Asp

85

90

95

Gln Leu Asn Asn Ser Lys Leu Glu Ile Ile His Gly Thr Glu Asp Leu

100

105

110

115

Ser Thr Lys Gly Ile Lys Tyr Gln Lys Val Asp Lys Leu Phe Leu His

120

125

130

Pro Lys Phe Asp Asp Trp Leu Leu Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu

135

140

145

Leu Lys Ser Pro Leu Asn Leu Ser Val Asn Arg Ile Pro Ile Cys Thr

150

155

160

Ser Glu Ile Ser Asp Ile Gln Ala Trp Arg Asn Cys Trp Val Thr Gly

165

170

175





Trp Gly Ile Thr Asn Thr Ser Glu Lys Gly Val Gln Pro Thr Ile Leu  
180 185 190 195

Gln Ala Val Lys Val Asp Leu Tyr Arg Trp Asp Trp Cys Gly Tyr Ile  
200 205 210

Leu Ser Leu Leu Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Thr Gln Asp Pro  
215 220 225

Gly Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Cys Asn  
230 235 240

Lys Lys Arg Asn Thr Ala Ile Trp Tyr Gln Val Gly Ile Val Ser Trp  
245 250 255

Gly Met Gly Cys Gly Lys Lys Asn Leu Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val  
260 265 270 275

Ser His Tyr Val Arg Trp Ile Ser Lys Gln Thr Ala Lys Ala Gly Arg  
280 285 290

Pro Tyr Met Tyr Glu Gln Asn Ser Ala Cys Pro Leu Val Leu Ser Cys  
295 300 305

Arg Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Phe Val Met Phe Leu Leu Thr  
310 315 320



&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1034

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (69)..(1025)

&lt;400&gt; 3

cccacgcgtt cggttgatc aatgtgggca gggcatcaag gcaggcacca ctgcactgga 60

atgacaac atg atg ctc cca ctt cta att gca ctg ctc atg gct tcc aag 110

Met Met Leu Pro Leu Leu Ile Ala Leu Leu Met Ala Ser Lys

1

5

10

gga caa gct aag gac cag caa gaa tca gtt ctg tgt ggc cac aga cct 158

Gly Gln Ala Lys Asp Gln Gln Glu Ser Val Leu Cys Gly His Arg Pro

15

20

25

30

gcc ttc cca aac tca tca tgg ctg cca ttg cgg gag ctg ctt gag gtc 206

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Leu Arg Glu Leu Leu Glu Val

35

40

45

cag cat ggt gag ttc cca tgg caa gtg agt atc cag atg ctt ggg aaa 254



Gln His Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Leu Gly Lys

50

55

60

cac ctg tgt gga ggc tcc atc atc cac cgg tgg tgg gtt ctg aca gca 302

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Ile His Arg Trp Trp Val Leu Thr Ala

65

70

75

gca cac tgc ttc ccg aga acc cta tta gaa ctg gta gca gtc aat gtc 350

Ala His Cys Phe Pro Arg Thr Leu Leu Glu Leu Val Ala Val Asn Val

80

85

90

act gtg gtc atg gga atc aag act ttc agt gac acc aac tta gag aga 398

Thr Val Val Met Gly Ile Lys Thr Phe Ser Asp Thr Asn Leu Glu Arg

95

100

105

110

aaa caa gtg cag aag atc att gct cac aga gac tac aaa ccg ccc gac 446

Lys Gln Val Gln Lys Ile Ile Ala His Arg Asp Tyr Lys Pro Pro Asp

115

120

125

ctt gac agc gac ctc tgc ctg ctc cta ctt gcc acg cca atc caa ttc 494

Leu Asp Ser Asp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Ile Gln Phe

130

135

140

aat aaa gac aaa atg ccc atc tgc ctg cca cag agg gag aac tcc tgg 542

Asn Lys Asp Lys Met Pro Ile Cys Leu Pro Gln Arg Glu Asn Ser Trp

145

150

155



10/49

gac cgg tgc tgg atg tca gag tgg gca tat act cat ggc cat ggt tca 590  
Asp Arg Cys Trp Met Ser Glu Trp Ala Tyr Thr His Gly His Gly Ser  
160 165 170

gcc aaa ggc tca aac atg cac ctg aag aag ctc agg gtg gtt cag att 638  
Ala Lys Gly Ser Asn Met His Leu Lys Lys Leu Arg Val Val Gln Ile  
175 180 185 190

agc tgg agg aca tgt gcg aag agg gtg act cag ctc tcc agg aac atg 686  
Ser Trp Arg Thr Cys Ala Lys Arg Val Thr Gln Leu Ser Arg Asn Met  
195 200 205

ctt tgt gct tgg aag gaa gtg ggc acc aac ggc aag tgc cag gga gac 734  
Leu Cys Ala Trp Lys Glu Val Gly Thr Asn Gly Lys Cys Gln Gly Asp  
210 215 220

agc ggg gca ccc atg gtc tgt gct aac tgg gag act cgg aga ctc ttt 782  
Ser Gly Ala Pro Met Val Cys Ala Asn Trp Glu Thr Arg Arg Leu Phe  
225 230 235

caa gtg ggt gtc ttc agc tgg ggc ata act tca gga tcc agg ggg agg 830  
Gln Val Gly Val Phe Ser Trp Gly Ile Thr Ser Gly Ser Arg Gly Arg  
240 245 250

cca ggc att ttt gtg tct gtg gct cag ttt atc cca tgg atc ctg gag 878





11/49

Pro Gly Ile Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro Trp Ile Leu Glu  
255 260 265 270

gag aca caa agg gag gga cga gcc ctt gcc ctc tca aag gcc tca aaa 926  
Glu Thr Gln Arg Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser Lys Ala Ser Lys  
275 280 285

agt ctc ttg gct ggc agt cca cgc tac cat ccc ata ttg cta agc atg 974  
Ser Leu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Tyr His Pro Ile Leu Leu Ser Met  
290 295 300

ggc tct caa ata ctg ctt gct gcc ata ttt tct gat gat aaa tca aat 1022  
Gly Ser Gln Ile Leu Leu Ala Ala Ile Phe Ser Asp Asp Lys Ser Asn  
305 310 315

tgc taa gctctg 1034  
Cys

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 319

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 4

Met Met Leu Pro Leu Leu Ile Ala Leu Leu Met Ala Ser Lys



12/49

1 5 10

Gly Gln Ala Lys Asp Gln Gln Glu Ser Val Leu Cys Gly His Arg Pro

15 20 25 30

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Leu Arg Glu Leu Leu Glu Val

35 40 45

Gln His Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Leu Gly Lys

50 55 60

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Ile His Arg Trp Trp Val Leu Thr Ala

65 70 75

Ala His Cys Phe Pro Arg Thr Leu Leu Glu Leu Val Ala Val Asn Val

80 85 90

Thr Val Val Met Gly Ile Lys Thr Phe Ser Asp Thr Asn Leu Glu Arg

95 100 105 110

Lys Gln Val Gln Lys Ile Ile Ala His Arg Asp Tyr Lys Pro Pro Asp

115 120 125

Leu Asp Ser Asp Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Ile Gln Phe

130 135 140



Asn Lys Asp Lys Met Pro Ile Cys Leu Pro Gln Arg Glu Asn Ser Trp

145

150

155

Asp Arg Cys Trp Met Ser Glu Trp Ala Tyr Thr His Gly His Gly Ser

160

165

170

Ala Lys Gly Ser Asn Met His Leu Lys Lys Leu Arg Val Val Gln Ile

175

180

185

190

Ser Trp Arg Thr Cys Ala Lys Arg Val Thr Gln Leu Ser Arg Asn Met

195

200

205

Leu Cys Ala Trp Lys Glu Val Gly Thr Asn Gly Lys Cys Gln Gly Asp

210

215

220

Ser Gly Ala Pro Met Val Cys Ala Asn Trp Glu Thr Arg Arg Leu Phe

225

230

235

Gln Val Gly Val Phe Ser Trp Gly Ile Thr Ser Gly Ser Arg Gly Arg

240

245

250

Pro Gly Ile Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro Trp Ile Leu Glu

255

260

265

270

Glu Thr Gln Arg Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser Lys Ala Ser Lys

275

280

285



14/49

Ser Leu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Tyr His Pro Ile Leu Leu Ser Met

290

295

300

Gly Ser Gln Ile Leu Leu Ala Ala Ile Phe Ser Asp Asp Lys Ser Asn

305

310

315

Cys

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1035

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (73)..(867)

&lt;400&gt; 5

ctgtggctgg catgttgtca gctctggctg gaggcaaagg tttggcaatt ttggactgga 60

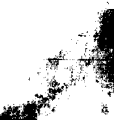
attgacaaga ag atg ttc cag ctt cta att ccc ctg ctt ttg gca ctc aag 111

Met Phe Gln Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu Ala Leu Lys

1

5

10





gga cat gcc cag gac aat cca gaa aac gta caa tgt ggc cac agg cct 159

Gly His Ala Gln Asp Asn Pro Glu Asn Val Gln Cys Gly His Arg Pro

15

20

25

gct ttt cca aac tcg tca tgg tta cca ttt cat gaa cgg ctt caa gtc 207

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Phe His Glu Arg Leu Gln Val

30

35

40

45

cag aat ggt gag tgc ccg tgg caa gtg agt atc cag atg tca cgg aaa 255

Gln Asn Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Ser Arg Lys

50

55

60

cac ctc tgt gga ggc tca atc tta cat tgg tgg tgg gtt ctg aca gcc 303

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Leu His Trp Trp Trp Val Leu Thr Ala

65

70

75

gca cac tgc ttc cga aga acc cta tta gac atg gcc gtg gta aat gtc 351

Ala His Cys Phe Arg Arg Thr Leu Leu Asp Met Ala Val Val Asn Val

80

85

90

act gtg gtc atg gga acg aga aca ttc agc aac atc cac tcg gag aga 399

Thr Val Val Met Gly Thr Arg Thr Phe Ser Asn Ile His Ser Glu Arg

95

100

105

aag caa gtg cag aag gtc att att cac aaa gat tac aaa ccg ccc cag 447

Lys Gln Val Gln Lys Val Ile Ile His Lys Asp Tyr Lys Pro Pro Gln



110	115	120	125	
ctc gac agt gac ctc tct ctg ctt cta ctt gcc aca cca gtg caa ttc				495
Leu Asp Ser Asp Leu Ser Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Val Gln Phe				
	130	135	140	
agc aat ttc aaa atg cct gtc tgc ctg cag gag gag gag agg acc tgg				543
Ser Asn Phe Lys Met Pro Val Cys Leu Gln Glu Glu Glu Arg Thr Trp				
	145	150	155	
gac tgg tgt tgg atg gca cag tgg gta acg acc aat ggg tat gac caa				591
Asp Trp Cys Trp Met Ala Gln Trp Val Thr Thr Asn Gly Tyr Asp Gln				
	160	165	170	
tat gat gac tta aac atg cac ctg gaa aag ctg aga gtg gtg cag att				639
Tyr Asp Asp Leu Asn Met His Leu Glu Lys Leu Arg Val Val Gln Ile				
	175	180	185	
agc cgg aaa gaa tgt gcc aag agg gta aac cag ctg tcc agg aac atg				687
Ser Arg Lys Glu Cys Ala Lys Arg Val Asn Gln Leu Ser Arg Asn Met				
	190	195	200	205
att tgt gct tcg aac gaa cca ggc acc aat ggt atc ttc aag gga gac				735
Ile Cys Ala Ser Asn Glu Pro Gly Thr Asn Gly Ile Phe Lys Gly Asp				
	210	215	220	



agt ggg gca cct ctg gtt tgt gct att tat gga acc cag aga ctc ttc 783

Ser Gly Ala Pro Leu Val Cys Ala Ile Tyr Gly Thr Gln Arg Leu Phe

225

230

235

caa gtg ggt gtc ttc agt ggg ggc ata aga tct ggc tcc agg ggg aga 831

Gln Val Gly Val Phe Ser Gly Gly Ile Arg Ser Gly Ser Arg Gly Arg

240

245

250

cct ggt atg ttt gtg tct gtg gct caa ttt att cca tga agccaggagg 880

Pro Gly Met Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro

255

260

265

agacagaaaa ggaggggaaa gcctacacca taatctcagg atccacgaga agccgagaag 940

ctcactggtg tgtgttctc agtaccctt cttgctagga ttgggtctc aaatgctgct 1000

ggccaccatg tttaccggtg ataaacctaa cyrcw

1035

<210> 6

<211> 265

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe Gln Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu Ala Leu Lys



Gly His Ala Gln Asp Asn Pro Glu Asn Val Gln Cys Gly His Arg Pro  
15 20 25

Ala Phe Pro Asn Ser Ser Trp Leu Pro Phe His Glu Arg Leu Gln Val  
30 35 40 45

Gln Asn Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Met Ser Arg Lys  
50 55 60

His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Leu His Trp Trp Trp Val Leu Thr Ala  
65 70 75

Ala His Cys Phe Arg Arg Thr Leu Leu Asp Met Ala Val Val Asn Val  
80 85 90

Thr Val Val Met Gly Thr Arg Thr Phe Ser Asn Ile His Ser Glu Arg  
95 100 105

Lys Gln Val Gln Lys Val Ile Ile His Lys Asp Tyr Lys Pro Pro Gln  
110 115 120 125

Leu Asp Ser Asp Leu Ser Leu Leu Leu Leu Ala Thr Pro Val Gln Phe  
130 135 140

Ser Asn Phe Lys Met Pro Val Cys Leu Gln Glu Glu Glu Arg Thr Trp





19/49

145	150	155
Asp Trp Cys Trp Met Ala Gln Trp Val Thr Thr Asn Gly Tyr Asp Gln		
160	165	170
Tyr Asp Asp Leu Asn Met His Leu Glu Lys Leu Arg Val Val Gln Ile		
175	180	185
Ser Arg Lys Glu Cys Ala Lys Arg Val Asn Gln Leu Ser Arg Asn Met		
190	195	200
Ile Cys Ala Ser Asn Glu Pro Gly Thr Asn Gly Ile Phe Lys Gly Asp		
210	215	220
Ser Gly Ala Pro Leu Val Cys Ala Ile Tyr Gly Thr Gln Arg Leu Phe		
225	230	235
Gln Val Gly Val Phe Ser Gly Gly Ile Arg Ser Gly Ser Arg Gly Arg		
240	245	250
Pro Gly Met Phe Val Ser Val Ala Gln Phe Ile Pro		
255	260	265

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1028

&lt;212&gt; DNA



<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (38)..(1000)

<400> 7

gtcagcctgg cctccaacac acagcacagc cagagcc atg atc ctg ccc tcc atc 55

Met Ile Leu Pro Ser Ile

1

5

ctg cta ctt gtt gcc cac acc ctg gaa gca aat gtt gag tgt ggt gtg 103

Leu Leu Leu Val Ala His Thr Leu Glu Ala Asn Val Glu Cys Gly Val

10

15

20

aga ccc ctg tat gat agc aga att caa tac tcc agg atc ata gaa ggg 151

Arg Pro Leu Tyr Asp Ser Arg Ile Gln Tyr Ser Arg Ile Ile Glu Gly

25

30

35

cag gag gct gag ctg ggt gag ttt cca tgg cag gtg agc att cag gaa 199

Gln Glu Ala Glu Leu Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Glu

40

45

50

agt gac cac cat ttc tgc ggc ggc tcc att ctc agt gag tgg tgg atc 247

Ser Asp His His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Ser Glu Trp Trp Ile

55

60

65

70



ctc acc gtg gcc cac tgc ttc tat gct cag gag ctt tcc cca aca gat 295  
Leu Thr Val Ala His Cys Phe Tyr Ala Gln Glu Leu Ser Pro Thr Asp  
75 80 85

ctc aga gtc aga gtg gga acc aat gac tta act act tca ccc gtg gaa 343  
Leu Arg Val Arg Val Gly Thr Asn Asp Leu Thr Thr Ser Pro Val Glu  
90 95 100

cta gag gtc acc acc ata atc cgg cac aaa ggc ttt aaa cgg ctg aac 391  
Leu Glu Val Thr Thr Ile Ile Arg His Lys Gly Phe Lys Arg Leu Asn  
105 110 115

atg gac aac gac att gcc ttg ttg ctg cta gcc aag ccc ttg gcg ttc 439  
Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Phe  
120 125 130

aat gag ctg acg gtg ccc atc tgc ctt cct ctc tgg ccc gcc cct ccc 487  
Asn Glu Leu Thr Val Pro Ile Cys Leu Pro Leu Trp Pro Ala Pro Pro  
135 140 145 150

agc tgg cac gaa tgc tgg gtg gca gga tgg ggc gta acc aac tca act 535  
Ser Trp His Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Asn Ser Thr  
155 160 165

gac aag gaa tct atg tca acg gat ctg atg aag gtg ccc atg cgt atc 583



Asp Lys Glu Ser Met Ser Thr Asp Leu Met Lys Val Pro Met Arg Ile  
170 175 180

ata gag tgg gag gaa tgc tta cag atg ttt ccc agc ctc acc aca aac 631  
Ile Glu Trp Glu Glu Cys Leu Gln Met Phe Pro Ser Leu Thr Thr Asn  
185 190 195

atg ctg tgt gcc tca tat ggt aat gag agc tac gat gct tgc cag ggt 679  
Met Leu Cys Ala Ser Tyr Gly Asn Glu Ser Tyr Asp Ala Cys Gln Gly  
200 205 210

gac agt ggg gga ccg ctt gtc tgc acc aca gat cct ggc agt agg tgg 727  
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Thr Asp Pro Gly Ser Arg Trp  
215 220 225 230

tac cag gtg ggc atc atc agc tgg ggc aag agc tgt gga aaa aaa ggc 775  
Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly Lys Lys Gly  
235 240 245

ttc cca ggg ata tat act gta ttg gca aag tat acc ctg tgg att gag 823  
Phe Pro Gly Ile Tyr Thr Val Leu Ala Lys Tyr Thr Leu Trp Ile Glu  
250 255 260

aaa ata gcc cag aca gag ggg aag ccc ctg gat ttt aga ggt cag agc 871  
Lys Ile Ala Gln Thr Glu Gly Lys Pro Leu Asp Phe Arg Gly Gln Ser  
265 270 275





tcc tct aac aag aag aaa aac aga cag aac aat cag ctc tcc aaa tcc 919  
Ser Ser Asn Lys Lys Lys Asn Arg Gln Asn Asn Gln Leu Ser Lys Ser  
280 285 290

cca gcc ctg aac tgc ccc caa agc tgg ctc ctg ccc tgt ctg ctg tcc 967  
Pro Ala Leu Asn Cys Pro Gln Ser Trp Leu Leu Pro Cys Leu Leu Ser  
295 300 305 310

ttt gca ctg ctt aga gcc ttg tcc aac tgg aaa taaaacaatg cagtctctga 1020  
Phe Ala Leu Leu Arg Ala Leu Ser Asn Trp Lys  
315 320

tccaccct 1028

<210> 8

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ile Leu Pro Ser Ile

1

5

Leu Leu Leu Val Ala His Thr Leu Glu Ala Asn Val Glu Cys Gly Val

10

15

20



Arg Pro Leu Tyr Asp Ser Arg Ile Gln Tyr Ser Arg Ile Ile Glu Gly  
25 30 35

Gln Glu Ala Glu Leu Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Glu  
40 45 50

Ser Asp His His Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Ser Glu Trp Trp Ile  
55 60 65 70

Leu Thr Val Ala His Cys Phe Tyr Ala Gln Glu Leu Ser Pro Thr Asp  
75 80 85

Leu Arg Val Arg Val Gly Thr Asn Asp Leu Thr Thr Ser Pro Val Glu  
90 95 100

Leu Glu Val Thr Thr Ile Ile Arg His Lys Gly Phe Lys Arg Leu Asn  
105 110 115

Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Lys Pro Leu Ala Phe  
120 125 130

Asn Glu Leu Thr Val Pro Ile Cys Leu Pro Leu Trp Pro Ala Pro Pro  
135 140 145 150

Ser Trp His Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Asn Ser Thr



155 160 165  
Asp Lys Glu Ser Met Ser Thr Asp Leu Met Lys Val Pro Met Arg Ile  
170 175 180  
Ile Glu Trp Glu Glu Cys Leu Gln Met Phe Pro Ser Leu Thr Thr Asn  
185 190 195  
Met Leu Cys Ala Ser Tyr Gly Asn Glu Ser Tyr Asp Ala Cys Gln Gly  
200 205 210  
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Thr Asp Pro Gly Ser Arg Trp  
215 220 225 230  
Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly Lys Lys Gly  
235 240 245  
Phe Pro Gly Ile Tyr Thr Val Leu Ala Lys Tyr Thr Leu Trp Ile Glu  
250 255 260  
Lys Ile Ala Gln Thr Glu Gly Lys Pro Leu Asp Phe Arg Gly Gln Ser  
265 270 275  
Ser Ser Asn Lys Lys Lys Asn Arg Gln Asn Asn Gln Leu Ser Lys Ser  
280 285 290



Pro Ala Leu Asn Cys Pro Gln Ser Trp Leu Leu Pro Cys Leu Leu Ser  
 295 300 305 310

Phe Ala Leu Leu Arg Ala Leu Ser Asn Trp Lys  
 315 320

<210> 9

<211> 1123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1096)

<400> 9

ggcctctgtc acccccgggc ccacagcaca gcccagggcc atg ctc ctg ttc tca 55

Met Leu Leu Phe Ser

1

5

gtg ttg ctg ctc ctg tcc ctg gtc acg gga act cag ctc ggt cca cgg 103

Val Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val Thr Gly Thr Gln Leu Gly Pro Arg

10

15

20

act cct ctc cca gag gct gga gtg gct atc cta ggc agg gct agg gga 151





Thr Pro Leu Pro Glu Ala Gly Val Ala Ile Leu Gly Arg Ala Arg Gly

25

30

35

gcc cac cgc cct cag ccc cgt cat ccc ccc agc cca gtc agt gaa tgt 199

Ala His Arg Pro Gln Pro Arg His Pro Pro Ser Pro Val Ser Glu Cys

40

45

50

ggt gac aga tct att ttc gag gga aga act cgg tat tcc aga atc aca 247

Gly Asp Arg Ser Ile Phe Glu Gly Arg Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Thr

55

60

65

ggg ggg atg gag gcg gag gtg ggt gag ttt ccg tgg cag gtg agt att 295

Gly Gly Met Glu Ala Glu Val Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile

70

75

80

85

cag gca aga agt gaa cct ttc tgt ggc ggc tcc atc ctc aac aag tgg 343

Gln Ala Arg Ser Glu Pro Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asn Lys Trp

90

95

100

tgg att ctc act gcg gct cac tgc tta tat tcc gag gag ctg ttt cca 391

Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Ser Glu Glu Leu Phe Pro

105

110

115

gaa gaa ctg agt gtc gtg ctg ggg acc aac gac tta act agc cca tcc 439

Glu Glu Leu Ser Val Val Leu Gly Thr Asn Asp Leu Thr Ser Pro Ser

120

125

130



atg gaa ata aag gag gtc gcc agc atc att ctt cac aaa gac ttt aag 487  
Met Glu Ile Lys Glu Val Ala Ser Ile Ile Leu His Lys Asp Phe Lys

135

140

145

aga gcc aac atg gac aat gac att gcc ttg ctg ctg ctg gct tcg ccc 535  
Arg Ala Asn Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ser Pro

150

155

160

165

atc aag ctc gat gac ctg aag gtg ccc atc tgc ctc ccc acg cag ccc 583  
Ile Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Pro Ile Cys Leu Pro Thr Gln Pro

170

175

180

ggc cct gcc aca tgg cgc gaa tgc tgg gtg gca ggt tgg ggc cag acc 631  
Gly Pro Ala Thr Trp Arg Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr

185

190

195

aat gct gct gac aaa aac tct gtg aaa acg gat ctg atg aaa gcg cca 679  
Asn Ala Ala Asp Lys Asn Ser Val Lys Thr Asp Leu Met Lys Ala Pro

200

205

210

atg gtc atc atg gac tgg gag gag tgt tca aag atg ttt cca aaa ctt 727  
Met Val Ile Met Asp Trp Glu Glu Cys Ser Lys Met Phe Pro Lys Leu

215

220

225

acc aaa aat atg ctg tgt gcc gga tac aag aat gag agc tat gat gcc 775



Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Lys Asn Glu Ser Tyr Asp Ala  
230 235 240 245

tgc aag ggt gac agt ggg ggg cct ctg gtc tgc acc cca gag cct ggt 823  
Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Pro Glu Pro Gly  
250 255 260

gag aag tgg tac cag gtg ggc atc atc agc tgg gga aag agc tgt gga 871  
Glu Lys Trp Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly  
265 270 275

gat aag aac acc cca ggg ata tac acc tcg ttg gtg aac tac aac ctc 919  
Asp Lys Asn Thr Pro Gly Ile Tyr Thr Ser Leu Val Asn Tyr Asn Leu  
280 285 290

tgg atc gag aaa gtg acc cag cta gga ggc agg ccc ttc aat gca gag 967  
Trp Ile Glu Lys Val Thr Gln Leu Gly Gly Arg Pro Phe Asn Ala Glu  
295 300 305

aaa agg agg act tct gtc aaa cag aaa cct atg ggc tcc cca gtc tcg 1015  
Lys Arg Arg Thr Ser Val Lys Gln Lys Pro Met Gly Ser Pro Val Ser  
310 315 320 325

gga gtc cca gag cca ggc agc ccc aga tcc tgg ctc ctg ctc tgt ccc 1063  
Gly Val Pro Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Trp Leu Leu Leu Cys Pro  
330 335 340



ctg tcc cat gtg ttg ttc aga gct att ttg tac tgataataaa atagaggcta 1116

Leu Ser His Val Leu Phe Arg Ala Ile Leu Tyr

345

350

ttcttttc

1123

<210> 10

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Leu Phe Ser

1

5

Val Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val Thr Gly Thr Gln Leu Gly Pro Arg

10

15

20

Thr Pro Leu Pro Glu Ala Gly Val Ala Ile Leu Gly Arg Ala Arg Gly

25

30

35

Ala His Arg Pro Gln Pro Arg His Pro Pro Ser Pro Val Ser Glu Cys

40

45

50

Gly Asp Arg Ser Ile Phe Glu Gly Arg Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Thr





55

60

65

Gly Gly Met Glu Ala Glu Val Gly Glu Phe Pro Trp Gln Val Ser Ile

70

75

80

85

Gln Ala Arg Ser Glu Pro Phe Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asn Lys Trp

90

95

100

Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Ser Glu Glu Leu Phe Pro

105

110

115

Glu Glu Leu Ser Val Val Leu Gly Thr Asn Asp Leu Thr Ser Pro Ser

120

125

130

Met Glu Ile Lys Glu Val Ala Ser Ile Ile Leu His Lys Asp Phe Lys

135

140

145

Arg Ala Asn Met Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ser Pro

150

155

160

165

Ile Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Pro Ile Cys Leu Pro Thr Gln Pro

170

175

180

Gly Pro Ala Thr Trp Arg Glu Cys Trp Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr

185

190

195



Asn Ala Ala Asp Lys Asn Ser Val Lys Thr Asp Leu Met Lys Ala Pro

200

205

210

Met Val Ile Met Asp Trp Glu Glu Cys Ser Lys Met Phe Pro Lys Leu

215

220

225

Thr Lys Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Lys Asn Glu Ser Tyr Asp Ala

230

235

240

245

Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Thr Pro Glu Pro Gly

250

255

260

Glu Lys Trp Tyr Gln Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Lys Ser Cys Gly

265

270

275

Asp Lys Asn Thr Pro Gly Ile Tyr Thr Ser Leu Val Asn Tyr Asn Leu

280

285

290

Trp Ile Glu Lys Val Thr Gln Leu Gly Gly Arg Pro Phe Asn Ala Glu

295

300

305

Lys Arg Arg Thr Ser Val Lys Gln Lys Pro Met Gly Ser Pro Val Ser

310

315

320

325

Gly Val Pro Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Trp Leu Leu Leu Cys Pro

330

335

340



Leu Ser His Val Leu Phe Arg Ala Ile Leu Tyr

345

350

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "76A5sc2-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 11

gacmacagg tgccagtcac ca

22

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT SP6",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 12



atttaggtga cactatagaa

20

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT FW",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 13

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

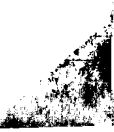
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT RV",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 14

caggaaacag ctatgacc

18





<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 15

atgcttctgc tatcgtggaa gg

22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "SPORT T7",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 16

taatacgact cactataggg

20

<210> 17

<211> 22



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 17

ctttgtgctg aggtcttcag tg

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-G",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 18

cagtcaatgt cactgtggtc at

22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-J",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 19

acttgccggtt ggtgcccact tc

22

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-P",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 20

gcactggaat gacaacatga tgc

23

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence: "No9-Q",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 21

attggcgtgg caagtaggag ca

22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-N",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 22

cgagtctccc agttagcaca ga

22

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-M' ",  
an artificially synthesized primer sequence.





<400> 23

cggtgacttg gtcattgtctg tg

22

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-K",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 24

ggatccatga aacgatggaa ggacagaag

29

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-0",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 25



cgcagagttc tgctcataca ta

22

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "No9-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 26

ggcatgtagc tcaactggcat g

21

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "29(-)",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 27

ggaccagcaa gaatcagttc tg

22



<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "17(+)95(+)",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 28

ctgctaccag ttctaatttg cc

22

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "G3PDH 5' ",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 29

gagattgttg ccatcaacga cc

22

<210> 30



<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "G3PDH 3' ",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 30

gttgaagtcg caggagacaa cc

22

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 31

agaggtcact gtcgagctgg g

21

<210> 32

<211> 22

<212> DNA





<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 32

tgtgaataat gaccttctgc ac

22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-A ",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 33

ttcagcaaca tccactcgga ga

22

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 34

aagcaagtgc agaaggtcat ta

22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "h-F",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 35

cattggtcgt taccactgt gc

22

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "PRO1-E",



an artificially synthesized primer sequence.

<400> 36

attctcaatg agtgggtgggt tct

23

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "PR01-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 37

ccagcacaca gcatattctt gg

22

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPR03-B",  
an artificially synthesized primer sequence.



<400> 38

ggaaacagct cctcggaata taagc

25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPR03-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 39

tggatgggct agttaagtcg ttggt

25

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPR03-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 40

ttcgagggaa gaactcggtta ttc

23





<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "hPRO3-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 41

tgtgaaaacg gatctgatga aagcg

25

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-B",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 42

cacctactgc caggatctgt gg

22

<210> 43



<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-D",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 43

ggctattttc tcaatccaca ggga

25

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-A",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 44

atagagtggg aggaatgctt acaga

25

<210> 45

<211> 25

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: "mPRO3-C",  
an artificially synthesized primer sequence.

<400> 45

gctacgatgc ttgccagggt g

21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06111

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40, C12P 21/08, C12Q 1/37 // (C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 9/00-99, C12N 15/00-90, C12N 1/00-5/28, C12P 21/00-08, G01N 33/53-579, C07K16/00-46, C12Q1/00-70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	WO, 99/26647, A1 (NOVO NORDISK A/S), 03 June, 1999 (03.06.99) & AU, 9913336, A	3 5-7
PA	Cancer Research, Vol. 59, No. 13, p. 3199-3205, (July 1 1999), John D. Hooper et al., "Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors"	1-15
X	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 24, (1997), p. 15434-15441, Jiuyu Sun et al., "A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)".	12
A	JP, 8-205893, A (SUMITOMO METAL INDUSTRIES, LTD.), 13 August, 1997 (13.08.97) (Family: none)	11, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 January, 2000 (25.01.00)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06111

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.245, No.3, p.658-665, (1998), Nobuhisa Kohno et al., "Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome".	1-15



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06111

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40,  
C12P 21/08, C12Q 1/37 // (C12P21/02, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/00~99, C12N 15/00~90, C12N 1/00~5/28, C12P 21/00~08, G01N 33/53~579,  
C07K16/00~46, C12Q1/00~70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P Y	WO, 99/26647, A1 (NOVO NORDISK A/S), 3.6月.1999 (03.06.99) & AU, 9913336, A	$\frac{3}{5-7}$
P A	Cancer Research, Vol. 59, No. 13, p. 3199-3205, (July 1 1999), John D. Hooper et al., "Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors"	1 - 15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.01.00

国際調査報告の発送日

22.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

印

4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.24, (1997), p.15434-15441, Jiuyu Sun et al., "A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)" .	1 2
A	JP, 8-205893, A (住友金属工業株式会社), 13. 8 月. 1997 (13. 08. 97) ファミリーなし	1 1, 1 2
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 245, No. 3 , p. 658-665 , (1998), Nobuhisa Kohno et al., "Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome" .	1 - 1 5

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <u>A61K 38/18, C07K 14/47</u> ✓		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 99/26647</b>
			(43) International Publication Date: 3 June 1999 (03.06.99)
(21) International Application Number: PCT/DK98/00510		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: 20 November 1998 (20.11.98)		Published With international search report.	
(30) Priority Data: 1324/97 20 November 1997 (20.11.97) DK 1394/97 3 December 1997 (03.12.97) DK			
(71) Applicant: NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK).			
(72) Inventor: FLODGAARD, Hans, Jakob; Melvillevej 6, DK-2900 Hellerup (DK).			
0 530 ✓ <u>          </u> A61K 32/18 ✓ → 424/		14/00 → 15/00  424/	
(54) Title: USE OF HEPARIN-BINDING PROTEIN FOR THE MODULATION OR PROPHYLAXIS OF APOPTOSIS OF MAMMALIAN CELLS			
(57) Abstract <p>The present invention relates to the use of a heparin-binding protein for modulating or decreasing apoptosis in mammalian cells of a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of a heparin-binding protein or pharmaceutically active fragment thereof.</p>			



## USE OF HEPARIN-BINDING PROTEIN FOR THE MODULATION OR PROPHYLAXIS OF APOPTOSIS OF MAMMALIAN CELLS

### FIELD OF INVENTION

5

The present invention relates to the use of a heparin-binding protein for modulating or decreasing apoptosis in cells of a mammal, mammalian particularly nerve cells, beta cells from the Islets of Langerhans and endothelial cells comprising administering to the mammal an effective amount of a heparin-binding protein or pharmaceutically active fragment thereof.

10

### BACKGROUND OF THE INVENTION

#### CELL APOPTOSIS

15

Cell apoptosis, also known as programmed cell death, is of central importance for the development and homeostasis of metazoan animals. Apoptosis is specifically a process in which, within the limits of a near-to-intact plasma membrane, catabolic enzymes degrade essential macromolecules, leading to a characteristic biochemical and ultrastructural death phenotype of cells (reviewed in Kroemer et al., 1997, Immunol. Today 18:44-51, Zamzami et al., 1997,

20

J. Bioenergetics and Biomembranes, 29:185-193). Specifically, cells receive various death inducing stimuli such as lack of obligatory survival factors, shortage of metabolic supply, ligation of death-signal-transmitting receptors (such as Fas/APO-1/CD95 and tumor necrosis factor receptors, contradictory signal combinations or subnecrotic damage by toxins, heat or irradiation. These stimuli can trigger mitochondrial permeability transition (PT), which in-

25

volves the formation of pores. These pores appear to consist of several proteins located in the inner and outer mitochondria membranes which cooperate with each other at the contact sites at contact sites where the two membranes come into close apposition. As a result, there is

mitochondrial dysfunction, specifically the collapse of mitochondrial transmembrane potential, uncoupling of the respiratory chain, release of soluble intermembrane proteins, outflow of

30

matrix calcium and glutathione, disruption of mitochondrial biogenesis and hyperproduction of superoxide anions. This mitochondrial dysfunction can cause activation and action of apoptogenic proteases with secondary endonuclease activation and consequently oligonu-



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						





cleosomal DNA fragmentation. It is thought that cytochrome c may play a role in the activation of apoptogenic proteases (Reed, 1997, Cell 91:559-562).

Apoptosis can serve as a prominent force in sculpting the developing organism, as a major  
5 mechanism for the precise regulation of cell numbers and as a defense mechanism to remove  
unwanted and potentially dangerous cells. However, in addition to the beneficial effects of  
programmed cell death, the inappropriate activation of apoptosis may cause or contribute to a  
variety of disorders (reviewed in Thompson, 1995, Science 267:1456-1461). These include  
virus-induced lymphocyte depletion (AIDS); cell death in neurodegenerative disorders char-  
10 acterized by the gradual loss of specific sets of neurons (e.g., Alzheimer's Disease, Parkin-  
son's disease, ALS, retinitis pigmentosa, spinal muscular atrophy and various forms of cere-  
bellar degeneration), cell death in blood cell disorders resulting from deprivation of growth  
factors (anemia associated with chronic disease, aplastic anemia, chronic neutropenia and  
myelodysplastic syndromes) and disorders arising out of an acute loss of blood flow (e.g.,  
15 myocardial infarctions and stroke).

#### ANTIAPOPTOSIS AGENTS

It is thought that treatments that can increase the apoptotic thresholds of specific cells may be  
20 beneficial in treatment of cell loss associated disorders (reviewed in Thompson, 1995, Science  
267:1456-1461). Examples of such treatments may be physiological inhibitors of apoptosis  
such as growth factors, extracellular matrix, CD40 ligand, neutral amino acids, zinc, estrogen,  
androgens. Alternatively, pharmacological agents such as calpain inhibitors, cysteine protease  
inhibitors, tumor promoters such as PMA, phenobarbital, alpha-hexachlorocyclohexane have  
25 been thought to act as inhibitors of apoptosis.

#### DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus is a systemic disease characterized by disorders in the actions of insulin and  
30 other regulatory hormones in the metabolism of carbohydrates, fats and proteins and in the  
structure and function of blood vessels. The primary symptom of diabetes is hyperglycemia,  
often accompanied by glucosuria the presence in urine of large amounts of glucose and  
polyuria, the excretion of large volumes of urine. Additional symptoms arise in chronic or



long standing diabetes. These symptoms include degeneration of the walls of blood vessels. Although many different organs are affected by these vascular changes, the nerves eyes and kidneys appear to be the most susceptible. As such, long-standing diabetes mellitus, even when treated with insulin, is a leading cause of blindness.

5

There are two recognized types of diabetes. Type I diabetes is of juvenile onset, ketosis-prone, develops early in life with much more severe symptoms and has a near-certain prospect of later vascular involvement. Control of this type of diabetes is difficult and requires exogenous insulin administration. Type II diabetes is of adult onset, ketosis-resistant, develops later in life is milder and has a more gradual onset.

10

One of the most significant advances in the history of medical science came in 1922 when Banting and Best demonstrated the therapeutic effects of insulin in diabetic dogs. However, even today, a clear picture of the basic biochemical defects of the disease is not known and diabetes remains a serious health problem. It is believed that two percent of the United States' population is afflicted with some form of diabetes. The introduction of orally effective hypoglycemic agents was an important development in the treatment of hyperglycemia. Oral hypoglycemic agents are normally used in the treatment of adult onset diabetes.

15

## 20 HEPARIN-BINDING PROTEIN

The covalent structure of two closely related proteins isolated from peripheral neutrophil leukocytes of human and porcine origin have recently been determined (cf. H. Flodgaard et al., 1991, Eur. J. Biochem. 197: 535-547; J. Pohl et al., 1990, FEBS Lett. 272: 200 ff.). Both proteins show a high similarity to neutrophil elastase, but owing to selective mutations of the active serine 195 and histidine 57 (chymotrypsin numbering (B.S. Hartley, "Homologies in Serine Proteinases", Phil. Trans. Roy. Soc. Series 257, 1970, p. 77 ff.)) the proteins lack protease activity. The proteins have been named human heparin-binding protein (hHBP) and porcine heparin-binding protein (pHBP), respectively, owing to their high affinity for heparin; Schafer et al. (W.M. Schafer et al., Infect. Immun. 53, 1986, p. 651 ff.) have named the protein cationic antimicrobial protein (CAP37) due to its antimicrobial activity.

25

30



HBP was originally studied because of its antibiotic and LPS binding properties (Gabay et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:5610-5614 and Pereira et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4733-7). However, accumulating evidence now supports the concept that HBP, in addition to its bactericidal role, is involved in the progression of inflammation due to its effect on the recruitment and activation of monocytes (Pereira et al., 1990, J. Clin. Invest. 85:1468-1476 and Rasmussen et al., 1996, FEBS Lett. 390:109-112), recruitment of T cells (Chertov et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 2935-2940), as well as on the induced contraction in endothelial cells and fibroblasts (Ostergaard and Flodgaard, 1992, J. Leuk. Biol. 51: 316-323). Ostergaard and Flodgaard, 1992, op. cit. Also disclose increased survival of monocytes treated with heparin-binding protein but do not speculate on the underlying mechanisms of this increased survival. Furthermore, in animal models of fecal peritonitis, HBP treatment has been shown to rescue mice from an otherwise lethal injury (Mercer-Jones et al., 1996, In Surgical Forum, pp. 105-108 and Wickel et al., 1997, In 4th International Congress on the Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis, Munich, Germany, pp. 413-416).

From the azurophil granules, a protein with the first 20 N-terminal amino acid residues identical to those of hHBP and CAP37 called azurocidin has also been isolated (J.E. Gabay et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, p. 5610 ff.; C.G. Wilde et al., J. Biol. Chem. 265, 1990, p. 2038 ff.) and its antimicrobial properties have been reported (D. Campanelli et al., J. Clin. Invest. 85, 1990, p. 904 ff.).

The structure of HBP appears from WO 89/08666 and H. Flodgaard et al., op. cit. HBP has otherwise been termed CAP37 (cf. WO 91/00907, U.S. Patent Nos. 5,458,874 and 5,484,885) and azurocidin (cf. C.G. Wilde et al., J. Biol. Chem. 265, 1990, p. 2038).

There is a need for an effective inhibitor of apoptosis that can treat disorders caused by apoptosis but does not cause disorders associated with the inhibition of apoptosis such as cancer, autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus, immune-mediated glomerulonephritis, and viral infections such as herpesviruses, poxviruses, adenoviruses. It is therefore an object of this invention to have an effective inhibitor of apoptosis for the use in treating disorders associated with increased apoptosis.



## SUMMARY OF THE INVENTION

It has surprisingly been found that heparin-binding protein (HBP) can decrease apoptosis of mammalian cells. As shown in the example herein, HBP is internalized into the mitochondria, does affect mitochondrial function and specifically PT pore formation.,

The invention is directed to a method of modulating or decreasing apoptosis in mammalian cells of a mammal, particularly beta cells of the Islets of Langerhans, nerve cells and endothelial cells, comprising administering to said mammal in need thereof a mammalian heparin-binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is stored in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof or a composition comprising said heparin-binding protein and a pharmaceutically effective carrier in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells. Additionally, the invention is directed to the use of said heparin-binding protein (HBP) or fragment thereof for the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of a condition resulting from apoptosis as well as its use in treating or preventing said condition.

The invention is further directed to a composition comprising said heparin-binding protein and a mitochondrial matrix targeting protein. As defined herein, a "mitochondrial matrix targeting protein" is a protein that has an N-terminal extension that functions as a targeting signal to the mitochondria. The targeting signal is a highly degenerate sequence having 20-30 residues capable of folding into a positively charged amphiphilic helix. The invention is further directed to uses of these compositions for the manufacture of a medicament for treating or preventing a disorder resulting from cell apoptosis. Furthermore, the invention is directed to a method for modulating and preventing mammalian cell apoptosis and accordingly a disorder resulting from cell apoptosis comprising administering to a mammal an effective amount of said composition.

30

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

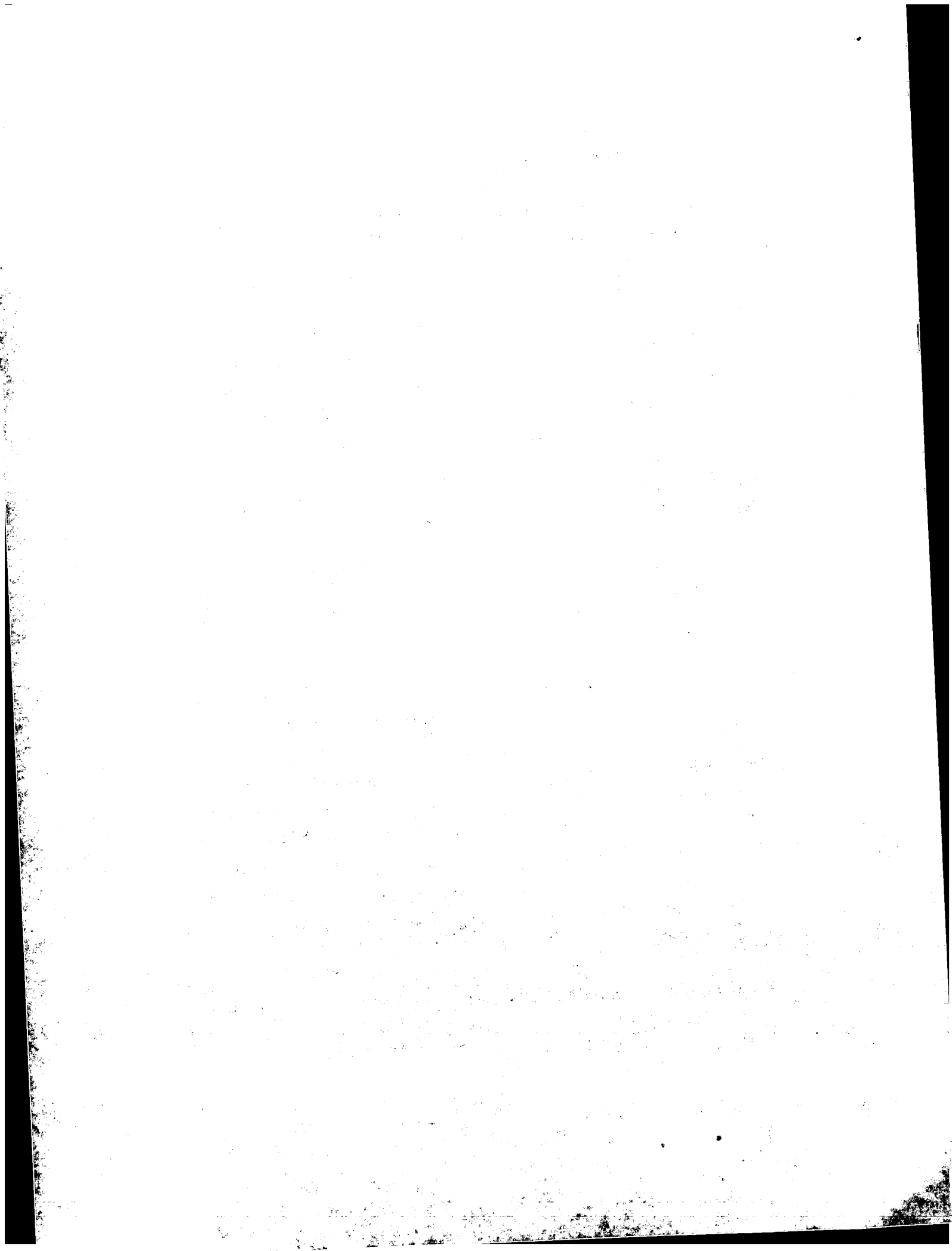




Figure 1 shows the effect of human HBP on MTT values in control and cytokine exposed RIN cells.

Figure 2 shows the effect of human HBP on accumulated NO (nitrite) in control and cytokine  
5 exposed RIN cells.

Figure 3 shows the release of HBP in the presence of PMA (Figure 3A) or fMLP (Figure 3B) from PMNs in the presence or absence of HUVECs.

10 Figure 4 shows the characterization of the binding of HBP to proteoglycans. Figure 4A shows HBP binding proteoglycans from <sup>35</sup>S-labeled endothelial cells are enriched by ion exchange chromatography and affinity purified on HBP-agarose. Fractions, eluted with a stepwise ionic strength gradient (250 - 1000 mM NaCl), are separated on SDS-PAGE and visualized by Phospho-Imaging. Uncoupled agarose is used as a control column. Molecular markers are  
15 given on the left. Figure 4B shows <sup>35</sup>S-labeled HBP-affinity purified proteoglycans, eluted with 300, 400 and 500 mM NaCl, were treated (+) with CABC or HNO<sub>2</sub>. Cleavage products were separated on agarose gels and visualized by Phospho-Imaging. As a control, untreated material (-) is analyzed under the same conditions. Figure 4C shows unlabelled endothelial cell proteoglycans eluted from the HBP-column with 300 mM NaCl or endothelial cell  
20 lysates, were digested with CABC and heparitinase (+) or left undigested (-). The cleavage products were separated by SDS-PAGE and transferred to Zeta-Probe membranes. Membranes were incubated with mAb 3G10 directed against desaturated glucuronate of heparitinase digested heparan sulfate proteoglycan core proteins. The positions of the different proteoglycans are indicated (\*). Molecular markers are given on the left.

25

Figure 5 shows a characterization of the internalization process.

Endothelial cells are pretreated with diverse substances able to inhibit receptor-ligand interactions, protein synthesis or actin polymerization before addition of HBP. Cells are preincubated with heparin (100 mg/ml) for 30 min. Alternatively, cells are pretreated with NH<sub>4</sub>Cl (50  
30 mM), cycloheximide (1 nM) or cytochalasin D (1 mM) for 60 min prior to addition of HBP (50 mg/ml). Bound and/or internalized HBP is quantified in intact or permeabilized cells by FACS analysis. As a positive and negative control respectively, endothelial cells are incu-



bated with HBP or buffer (control) alone followed by incubation with primary and secondary antibodies as described. Data represent the MFI  $\pm$  SD (n=3). Figure 5B shows CHO wildtype (CHO-K1) and heparan sulfate proteoglycan deficient pgsD 677 cells are treated with HBP for indicated time periods. Cells are permeabilized and analyzed as described above.

5

Figure 6 shows the subcellular fractionation of HBP-treated HUVECs. Equal amounts of protein from the various cell fractions are subjected to Western blotting using anti-HBP (upper panel) and anti-p33 (lower panel).

10 Figure 7 shows binding of HBP to rp33. In Figure 7A, microtiter plates are coated with H kininogen, HBP or the control protein KLH (1 mg/ml) followed by the incubation of serial dilutions (starting concentration 2 mg/ml, two fold dilution) of rp33 (fusion protein) or the fusion partner MBP. Bound protein is detected by a rabbit antiserum raised against the fusion partner MBP (1:2500 v/v) and a peroxidase-conjugated secondary antibody against rabbit IgG  
15 (1:3000 v/v). The absorption at 405 nm is presented in arbitrary units. Overlay plots of the binding of rp33 to immobilized HBP in the absence (Figure 7B) or presence (Figure 7C) of  $Zn^{2+}$  using plasmon resonance spectroscopy. Increasing concentrations of rp33 (6.25, 12.5, 25, 50 or 100 mg/ml) or MBP (100 mg/ml) are applied for 3 min during the association phase followed by injection of buffer alone to monitor the dissociation of formed complexes.

20

Figure 8 shows colocalization of HBP with p33 and HBP with mitochondria. In Figures 8A and B, endothelial cells are incubated with FITC-labeled HBP (green) for 6 hours, fixed in 4% formaldehyde and incubated with an antibody against rp33 followed by a Texas Red conjugated secondary antibody against rabbit IgG (red). The panel DOUBLE shows an overlay of  
25 the FITC and the Texas Red staining. In the panel SUBTRACT, the FITC signal is subtracted from the Texas Red signal. Magnification = 310X. In Figure 8C, endothelial cells are incubated with unconjugated HBP for 30 minutes, fixed in 4% formaldehyde and incubated firstly with a biotinylated rabbit-anti-HBP antibody followed by FITC-streptavidin, and secondly mAb 1273 against human mitochondria followed by a Texas Red conjugated secondary anti-  
30 body against mouse IgG. Colocalization is shown in the panel DOUBLE and subtraction in panel SUBTRACT. Magnification = 310X.



Figure 9 shows the effect of human heparin-binding protein on apoptosis induced by removal of FCS.

Figure 10 shows the effect of HBP on hydrogen peroxide treated cells.

5

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

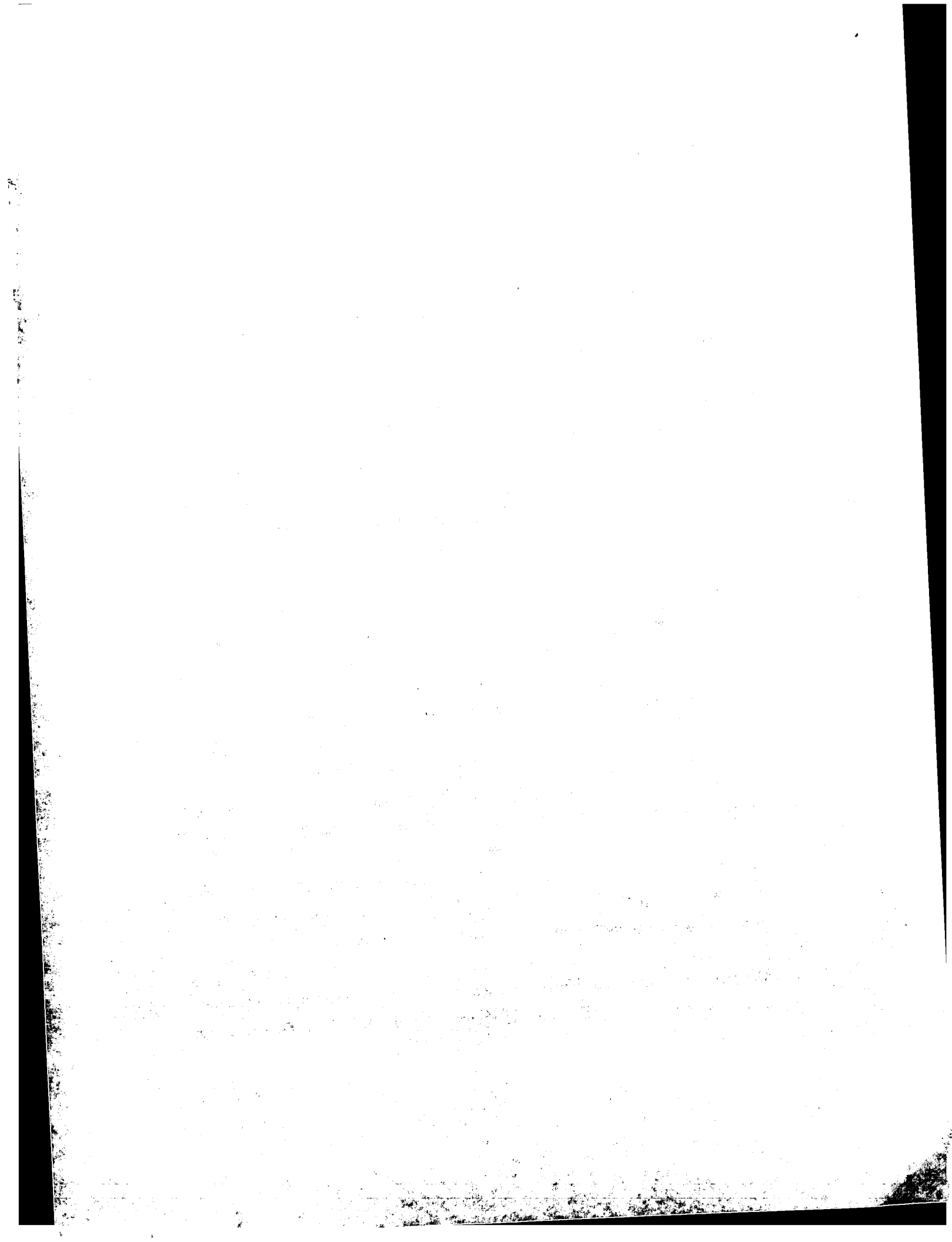
The HBP may suitably be of mammalian, in particular human or porcine, origin. In particular, the HBP is a mature human HBP which has at least about an 80% identity with the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1, more preferably at least about 90%, even more preferably at least about 95%, and most preferably at least about 97% (hereinafter "homologous polypeptides"), which qualitatively retain the activity of said heparin-binding protein, or a fragment thereof which inhibits the entry of a pathogen into a mononuclear (e.g., monocyte or macrophage) cells of a patient. Alternatively, the HBP is a mature porcine HBP which has at least about an 80% identity with the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, more preferably at least about 90%, even more preferably at least about 95%, and most preferably at least about 97%, which qualitatively retain the activity of said heparin-binding protein, or a fragment thereof which inhibits decreases or modulates apoptosis of mammalian cells in a mammal. In a preferred embodiment, the mammal is a human patient.

20

In a preferred embodiment, the homologous polypeptides have an amino acid sequence which differs by five amino acids, preferably by four amino acids, more preferably by three amino acids, even more preferably by two amino acids, and most preferably by one amino acid from the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS:1 or 2. The degree of identity between two or more amino acid sequences may be determined by means of computer programs known in the art such as GAP provided in the GCG program package (Needleman and Wunsch, 1970, Journal of Molecular Biology 48:443-453). For purposes of determining the degree of identity between two amino acid sequences for the present invention, GAP is used with the following settings: GAP creation penalty of 3.0 and GAP extension penalty of 0.1.

25  
30

The amino acid sequences of the homologous polypeptides differ from the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 1 or 2 by an insertion or deletion of one or more amino acid



residues and/or the substitution of one or more amino acid residues by different amino acid residues. Preferably, amino acid changes are of a minor nature, that is, conservative amino acid substitutions that do not significantly affect the folding and/or activity of the protein; small deletions, typically of one to about 30 amino acids; small amino- or carboxyl-terminal extensions, such as an amino-terminal methionine residue; a small linker peptide of up to  
5 about 20-25 residues; or a small extension that facilitates purification by changing net charge or another function, such as a poly-histidine tract, an antigenic epitope or a binding domain.

Examples of conservative substitutions are within the group of basic amino acids (such as arginine, lysine and histidine), acidic amino acids (such as glutamic acid and aspartic acid), polar amino acids (such as glutamine and asparagine), hydrophobic amino acids (such as leucine, isoleucine and valine), aromatic amino acids (such as phenylalanine, tryptophan and tyrosine) and small amino acids (such as glycine, alanine, serine, threonine and methionine). Amino acid substitutions which do not generally alter the specific activity are known in the art  
10 and are described, e.g., by H. Neurath and R.L. Hill, 1979, in, *The Proteins*, Academic Press, New York. The most commonly occurring exchanges are: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly as well as these in reverse.

20 The heparin binding protein may be encoded by a nucleic acid sequence having at least about an 80% identity with the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:3 (which encodes mature human HBP depicted in SEQ ID NO:1), SEQ ID NO:5 (which encodes a human HBP which includes the pro sequence and sequence of the mature protein, depicted in SEQ ID NO:6), SEQ ID NO:7 (which encodes human HBP which includes the signal sequence, the pro sequence and sequence of the mature protein, depicted in SEQ ID NO:8) or SEQ ID NO:4  
25 (which encodes porcine HBP depicted in SEQ ID NO:2), SEQ ID NO:9 (which encodes a porcine HBP which includes the pro sequence and sequence of the mature protein depicted in SEQ ID NO:10), SEQ ID NO:11 (which encodes porcine HBP which includes the signal sequence, the pro sequence and sequence of the mature protein depicted in SEQ ID NO:12),  
30 more preferably at least about 90%, even more preferably at least about 95%, and most preferably at least about 97%, as determined by agarose gel electrophoresis. The nucleic acid se-





quence may be of genomic, cDNA, RNA, semisynthetic, synthetic origin, or any combinations thereof.

IVGGRKARPRQFPFLASIQNQGRHFCGGALIHARFVMTAASCFQSQNPGVSTTVLGA  
5 YDLRRRERQSRQTFSISSMSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILPLPLQNA  
TVEAGTRCQVAGWGSQRSGGRLSRFPRFVNVTVPEDQCRPNNVCTGVLTRRGGIC  
NGDGGTPLVCEGLAHGVASFSLGPCGRGPDDFFTRVALFRDWIDGVLNNPGPGPA\*  
(SEQ IDNO:1)

10 IVGG RRAQPQEFPF LASIQKQGRP FCAGALVHPR FVLTAASCFR GKNSGSASVV  
LGAYDLRQQE QSRQTFSIRS ISQNGYDPRQ NLNDVLLLQL DREARLTPSV  
ALVPLPPQNA TVEAGTNCQVEAGWGTQRLRR LFSRFPRVLN VTVTSNPCLP  
RDMCIGVFSR RGRISQGDRG TPLVCNGLAQ GVASFLRRRF RRSSGFFTRV  
ALFRNWIDSV LNNPPA\* (SEQ ID NO:2)

15 ATCGTTGGCGGC CGGAAGGCGA GGCCCCGCCA GTTCCCGTTC  
CTGGCCTCCA TTCAGAATCA AGGCAGGCAC TTCTGCGGGG GTGCCCTGAT  
CCATGCCCGCTTCGTGATGA CCGCGGCCAG CTGCTTCCAA AGCCAGAACC  
CCGGGGTTAG CACCGTGGTG CTGGGTGCCT ATGACCTGAG GCGGCGGGAG  
20 AGGCAGTCCC GCCAGACGTT TTCCATCAGCAGCATGAGCG AGAATGGCTA  
CGACCCCCAG CAGAACCTGA ACGACCTGAT GCTGCTTCAG CTGGACCGTG  
AGGCCAACCT CACCAGCAGC GTGACGATAC TGCCACTGCC TCTGCA-  
GAACGCCACGGTGG AAGCCGGCAC CAGATGCCAG GTGGCCGGCT GGGGGAG-  
CCA GCGCAGTGGG GGGCGTCTCT CCCGTTTTCC CAGGTTCGTC AACGTGACTG  
25 TGACCCCCGA GGACCAGTGTGCCCCAACA ACGTGTGCAC CGGTGTGCTC  
ACCCGCCGCG GTGGCATCTG CAATGGGGAC GGGGGCACCC CCCTCGTCTG  
CGAGGGCCTG GCCCACGGCG TGGCCTCCTT TTCCCTGGGGCCCTGTGGCC  
GAGGCCCTGA CTTCTTCACC CGAGTGGCGC TCTTCCGAGA CTGGATCGAT  
GGCGTTTTAA ACAATCCGGG ACCGGGGCCA GCCTAG \* (SEQ ID NO:3)

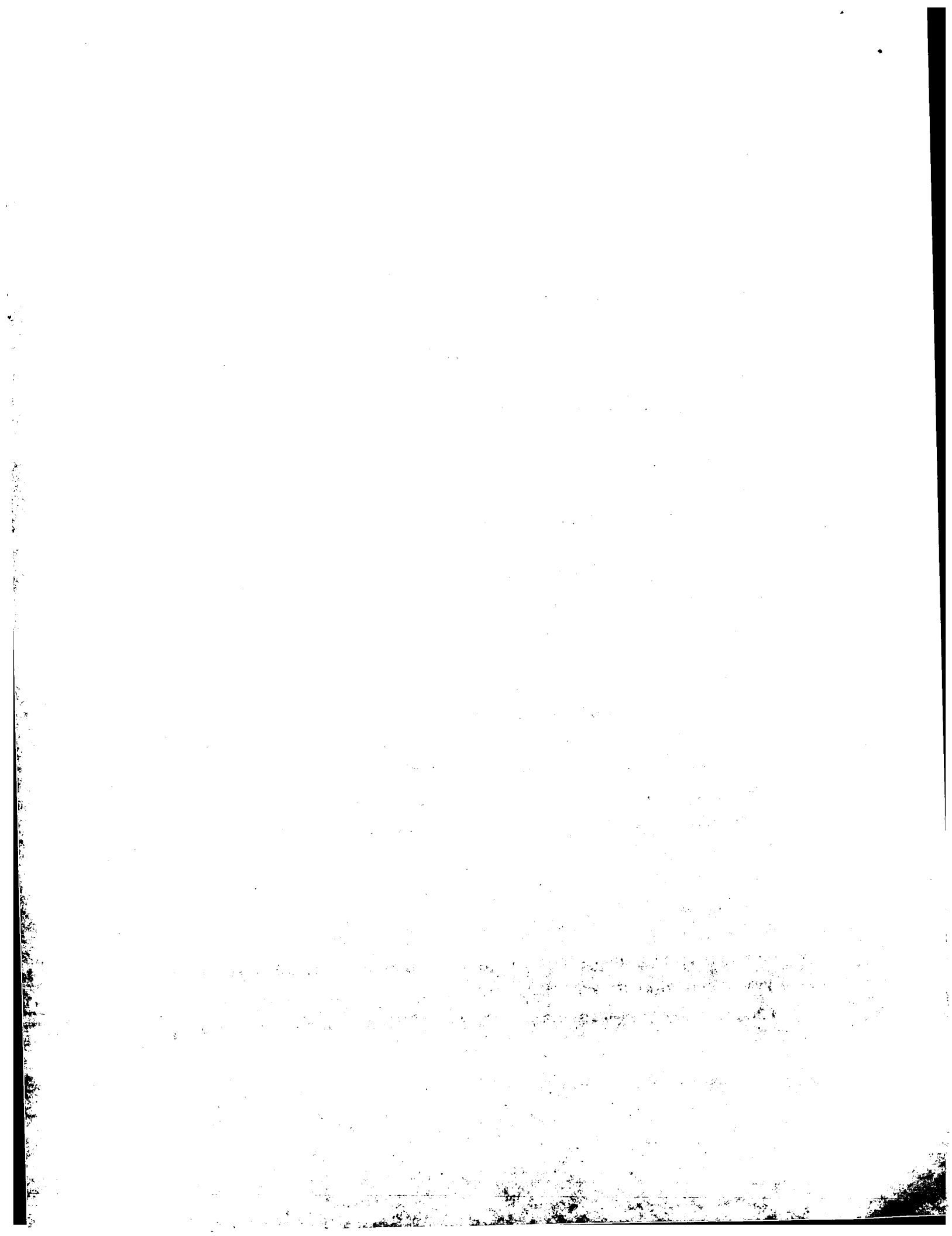
30 AT TGTGGGCGGC AGGAGGGCCC AGCCGCAGGA GTTCCCGTTT CTGGCCTCCA  
TTCAGAAACA AGGGAGGCCC TTTGCGCCG GAGCCCTGGT CCATCCCCGC



TTCGTCCTGA CAGCGGCCAG CTGCTTCCGT GGCAAGAACA GCGGAAGTGC  
CTCTGTGGTG CTGGGGGCCT ATGACCTGAG GCAGCAGGAG CAGTCCCGGC  
AGACATTCTC CATCAGGAGC ATCAGCCAGA ACGGCTATGA YCCCCGGCAG  
AATCTGAACG ATGTGCTGCT GCTGCAGCTG GACCGTGAGG CCAGACTCAC  
5 CCCCAGTGTG GCCCTGGTAC CGCTGCCCCC GCAGAATGCC ACAGTGGAAG  
CTGGCACCAA CTGCCAAGTTGCGGGCTGGG GGACCCAGCG GCTTAGGAGG  
CTTTTCTCCC GCTTCCCAAG GGTGCTCAAT GTCACCGTGA CCTCAAACCC  
GTGTCTCCCC AGAGACATGT GCATTGGTGT CTTACGCCGC CGGGGCCGCA  
TCAGCCAGGG AGACAGAGGC ACCCCCCTCG TCTGCAACGG CCTGGCGCAG  
10 GGGGTGGCCT CCTTCCTCCG GAGGCGTTTC CGCAGGAGCT CCGGCTTCTT  
CACCCGCGTG GCGCTCTTCA GAAATTGGAT TGATTAGTT CTCAACAACC  
CGCCGGCCTGA\* (SEQ ID NO:4)

GGCTCCAGCCCC TTTTGGAC ATCGTTGGCGGC CGGAAGGCGA GGCCCCGCCA  
15 GTTCCCGTTC CTGGCCTCCA TTCAGAATCA AGGCAGGCAC TTCTGCGGGG  
GTGCCCTGAT CCATGCCCGCTTCGTGATGA CCGCGGCCAG CTGCTTCCAA  
AGCCAGAACC CCGGGGTTAG CACCGTGGTG CTGGGTGCCT ATGACCTGAG  
GCGGCGGGAG AGGCAGTCCC GCCAGACGTT TTCCATCAGCAGCATGAGCG  
AGAATGGCTA CGACCCCCAG CAGAACCTGA ACGACCTGAT GCTGCTTCAG  
20 CTGGACCGTG AGGCCAACCT CACCAGCAGC GTGACGATAC TGCCACTGCC  
TCTGCAGAACGCCACGGTGG AAGCCGGCAC CAGATGCCAG GTGGCCGGCT  
GGGGGAGCCA GCGCAGTGGG GGGCGTCTCT CCCGTTTTCC CAGGTTCGTC  
AACGTGACTG TGACCCCCGA GGACCAGTGTGCCCCAACA ACGTGTGCAC  
CGGTGTGCTC ACCCGCCGCG GTGGCATCTG CAATGGGGAC  
25 GGGGGCACCC CCCTCGTCTG CGAGGGCCTG GCCCACGGCG TGGCCTCCTT  
TTCCCTGGGGCCCTGTGGCC GAGGCCCTGA CTTCTTCACC CGAGTGGCGC  
TCTTCCGAGA CTGGATCGAT GGC GTTTTAA ACAATCCGGG ACCGGGGCCA  
GCCTAG \* (SEQ ID NO:5)

30 GSSPLLDIVGGRKARPRQFPFLASIQNQRHFCGGALIHARFVMTAASCFQSQNPGVS  
TVVLGAYDLRRRERQSRQTFSSMSSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILP  
LPLQNATVEAGTRCQVAGWGSQRS GGRLSRFPFVNVTVPEDQCRPNNVCTGVL T



RRGGICNGDGGTPLVCEGLAHGVASFSLGPCGRGPDDFFTRVALFRDWIDGVLNNPGP  
GPA\*(SEQ ID NO:6)

ATGACCCGGC TGACAGTCCT GGCCCTGCTG GCTGGTCTGC TGGCGTCCTC  
5 GAGGGCC GGCTCCAGCCCC TTTTGGAC ATCGTTGGCGGC CGGAAGGCGA  
GGCCCCGCCA GTTCCCGTTC CTGGCCTCCA TTCAGAAATCA AGGCAGGCAC  
TTCTGCGGGG GTGCCCTGAT CCATGCCCGCTTCGTGATGA CCGCGGCCAG  
CTGCTTCCAA AGCCAGAACC CCGGGGTTAG CACCGTGGTG CTGGGTGCCT AT-  
GACCTGAG GCGGCGGGAG AGGCAGTCCC GCCAGACGTT TTCCATCAGCAG-  
10 CATGAGCG AGAATGGCTA CGACCCCCAG CAGAACCTGA ACGACCTGAT  
GCTGCTTCAG CTGGACCGTG AGGCCAACCT CACCAGCAGC GTGACGATAC  
TGCCACTGCC TCTGCAGAACGCCACGGTGG AAGCCGGCAC CAGATGCCAG  
GTGGCCGGCT GGGGGAGCCA GCGCAGTGGG GGGCGTCTCT CCCGTTTTCC  
CAGGTTTCGC AACGTGACTG TGACCCCCGA GGACCAGTGTCGCCCCAACA  
15 ACGTGTGCAC CGGTGTGCTC ACCCGCCGCG GTGGCATCTG CAATGGGGAC  
GGGGGCACCC CCCTCGTCTG CGAGGGCCTG GCCCACGGCG TGGCCTCCTT  
TTCCCTGGGGCCCTGTGGCC GAGGCCCTGA CTTCTTCACC CGAGTGGCGC  
TCTTCCGAGA CTGGATCGAT  
GGCGTTTTAA ACAATCCGGG ACCGGGGCCA GCCTAG \* (SEQ ID NO:7)

20 IVGGRKARPRQFPFLASIQNQGRHFCGGALIHARFVMTAASCFQSQNPVSTVVLGA  
YDLRRRERQSRQTFSISSMSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILPLPLQNA  
TVEAGTRCQVAGWGSQRSGGRLSRFPRFVNVTVPEDQCRPNNVCTGVLTRGGIC  
NGDGGTPLVCEGLAHGVASFSLGPCGRGPDDFFTRVALFRDWIDGVLNNPGPGPA\*  
25 (SEQ ID NO:8)

ATGCCAGCAC TCAGATTCCT GGCCCTGCTG GCCAGCCTGC TGGCAACCTC  
CAGGGTT AT TGTGGGCGGC AGGAGGGCCC AGCCGCAGGA GTTCCCGTTT  
CTGGCCTCCA TTCAGAAACA AGGGAGGCC TTTTGCGCCG GAGCCCTGGT  
30 CCATCCCCGC TTCGTCCTGA CAGCGGCCAG CTGCTTCCGT GGCAAGAACA  
GCGGAAGTGC CTCTGTGGTG CTGGGGGCCT ATGACCTGAG GCAGCAGGAG  
CAGTCCCGGC AGACATTCTC CATCAGGAGC ATCAGCCAGA ACGGCTATGA



- YCCCCGGCAG AATCTGAACG ATGTGCTGCT GCTGCAGCTG GACCGTGAGG  
CCAGACTCAC CCCAGTGTG GCCCTGGTAC CGCTGCCCCC GCAGAATGCC  
ACAGTGGAAG CTGGCACCAA CTGCCAAGTTGCGGGCTGGG GGACCCAGCG  
GCTTAGGAGG CTTTCTCCC GCTTCCCAAG GGTGCTCAAT GTCACCGTGA  
5 CCTCAAACCC GTGTCTCCCC AGAGACATGT GCATTGGTGT CTTAGCCGC  
CGGGGCCGCA TCAGCCAGGG AGACAGAGGC ACCCCCCTCG TCTGCAACGG  
CCTGGCGCAG GCGTGGCCT CTTCTCCG GAGGCGTTTC CGCAGGAGCT  
CCGGCTTCTT CACCCGCGTG GCGCTCTCA GAAATTGGAT TGATTAGTT  
CTCAACAACC CGCCGGCCTGA\* (SEQ ID NO:9)
- 10 MPALRFLALL ASLLATSRV IVGG RRAQPQEPF LASIQKQGRP  
FCAGALVHPR FVLTAASCFR GKNSGSASVV LGAYDLRQOE QSRQTSIRS  
ISQNGYDPRQ NLNDVLLLQL DREARLTPSV ALVPLPPQNA TVEAGTNCQV  
AGWGTQRLRR LFSRFPRVLN VTVTSNPCLP RDMCIGVFSR RGRISQDRG  
15 TPLVCNGLAQ GVASFLRRRF RRSSGFFTRV ALFRNWIDSV LNNPPA\* (SEQ ID  
NO:10)
- ATG CCAGCAC TCAGATTCCT GGCCCTGCTG GCCAGCCTGC TGGCAACCTC  
CAGG GTT GGC TTG GCC ACC CTG GCA GAC ATT GTGGGCGGC AGGAGGGCCC  
20 AGCCGCAGGA GTTCCCGTTT CTGGCCTCCA TTCAGAAACA AGGGAGGCCC  
TTTtGCGCCG GAGCCCTGGT CCATCCCCGC TTCGTCCTGA CAGCGGCCAG  
CTGCTTCCGT GGCAAGAACA GCGGAAGTGC CTCTGTGGTG CTGGGGGCCT AT-  
GACCTGAG GCAGCAGGAG CAGTCCCGGC AGACATTCTC CATCAGGAGC AT-  
CAGCCAGA ACGGCTATGA CCCCCGGCAG AATCTGAACG ATGTGCTGCT  
25 GCTGCAGCTG GACCGTGAGG CCAGACTCAC CCCAGTGTG GCCCTGGTAC  
CGCTGCCCCC GCAGAATGCC ACAGTGGAAG CTGGCACCAA  
CTGCCAAGTTGCGGGCTGGG GGACCCAGCG GCTTAGGAGG CTTTCTCCC  
GCTTCCCAAG GGTGCTCAAT GTCACCGTGA CCTCAAACCC GTGTCTCCCC  
AGAGACATGT GCATTGGTGT CTTAGCCGC CGGGGCCGCA TCAGCCAGGG  
30 AGACAGAGGC ACCCCCCTCG TCTGCAACGG CCTGGCGCAG GCGTGGCCT  
CCTTCTCCG GAGGCGTTTC CGCAGGAGCT CCGGCTTCTT CACCCGCGTG





GCGCTCTTCA GAAATTGGAT TGATTCAAGTT CTCAACAACC  
CGCCGGCCTGA\*(SEQ ID NO:11)

MPALRFLALL ASLLATSRV GLATLAD IVGG RRAQPQEFPP LASIQKQGRP  
5 FCAGALVHPR FVLTAASCFR GKNSGSASVV LGAYDLRQQE QSRQTFSIRS  
ISQNGYDPRQ NLNDVLLLQL DREARLTPSV ALVPLPPQNA TVEAGTNCQV  
AGWGTQRLRR LFSRFPRVLN VTVTSNPCLP RDMCIGVFSR RGRISQGDRG  
TPLVCNGLAQ GVASFLRRRF RRSSGFFTRV ALFRNWIDSV LNNPPA\* (SEQ ID  
NO:12)

10

The degree of identity between two nucleic acid sequences may be determined by means of computer programs known in the art such as GAP provided in the GCG program package (Needleman and Wunsch, 1970, Journal of Molecular Biology 48:443-453). For purposes of determining the degree of identity between two nucleic acid sequences for the present inven-  
15 tion, GAP is used with the following settings: GAP creation penalty of 5.0 and GAP extension penalty of 0.3.

Modification of the nucleic acid sequence encoding the HBP may be necessary for the synthesis of polypeptide sequences substantially similar to the HBP. The term "substantially similar" to the HBP refers to non-naturally occurring forms of the HBP. These polypeptide sequences may differ in some engineered way from the HBP isolated from its native source.  
20 For example, it may be of interest to synthesize variants of the HBP where the variants differ in specific activity, thermostability, pH optimum, or the like using, e.g., site-directed mutagenesis. The analogous sequence may be constructed on the basis of the nucleic acid sequence presented as the HBP encoding part of SEQ ID NOS:1, 2, 6, 8, 10, or 12, e.g., a sub-  
25 sequence thereof, and/or by introduction of nucleotide substitutions which do not give rise to another amino acid sequence of the HBP encoded by the nucleic acid sequence, but which corresponds to the codon usage of the host organism intended for production of the enzyme, or by introduction of nucleotide substitutions which may give rise to a different amino acid  
30 sequence. For a general description of nucleotide substitution, see, e.g., Ford ET al., 1991, in Protein Expression and Purification 2:95-107.



It will be apparent to those skilled in the art that such substitutions can be made outside the regions critical to the function of the molecule and still result in an active polypeptide sequence. Amino acid residues essential to the activity of the polypeptide encoded by the isolated nucleic acid sequence of the invention, and therefore preferably not subject to substitution, may be identified according to procedures known in the art, such as site-directed mutagenesis or alanine-scanning mutagenesis (see, e.g., Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085). In the latter technique mutations are introduced at every residue in the molecule, and the resultant mutant molecules are tested for HBP activity to identify amino acid residues that are critical to the activity of the molecule.

The heparin-binding protein may also be encoded by a nucleic acid sequence that hybridizes to a nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 8, 10, and 12 at low to high stringency conditions. Low to high stringency conditions are defined as prehybridization and hybridization at 42°C in 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 ug/ml sheared and denatured salmon sperm DNA and either 25, 35 or 50% formamide for low, medium and high stringencies, respectively. The carrier material is washed three times each for 30 minutes using 2X SSC, 0.2% SDS preferably at least at 50°C (very low stringency), more preferably at least at 55°C (low stringency), more preferably at least at 60°C (medium stringency), more preferably at least at 65°C (medium-high stringency), even more preferably at least at 70°C (high stringency) and most preferably at least at 75°C (very high stringency).

#### PREPARATION OF HBP

A nucleic acid sequence encoding HBP may be prepared synthetically by established standard methods, e.g., the phosphoramidite method described by S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869, or the method described by Matthes et al., EMBO Journal 3, 1984, pp. 801-805. According to the phosphoramidite method, oligonucleotides are synthesized, e.g., in an automatic DNA synthesizer, purified, annealed, ligated and cloned in suitable vectors.

The techniques used to isolate or clone a nucleic acid sequence encoding the heparin binding protein used in the method of the present invention are known in the art and include isolation



from genomic DNA, preparation from cDNA, or a combination thereof. The cloning of the nucleic acid sequences of the present invention from such genomic DNA can be effected, e.g., by using the well known polymerase chain reaction (PCR) or antibody screening of expression libraries to detect cloned DNA fragments with shared structural features. See, e.g., Innis et al., 1990, A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Other nucleic acid amplification procedures such as ligase chain reaction (LCR), ligated activated transcription (LAT) and nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) may be used.

The nucleic acid sequence is then inserted into a recombinant expression vector which may be any vector which may conveniently be subjected to recombinant DNA procedures. The choice of vector will often depend on the host cell into which it is to be introduced. Thus, the vector may be an autonomously replicating vector, i.e., a vector which exists as an extrachromosomal entity, the replication of which is independent of chromosomal replication, e.g., a plasmid. Alternatively, the vector may be one which, when introduced into a host cell, is integrated into the host cell genome and replicated together with the chromosome(s) into which it has been integrated.

In the vector, the nucleic acid sequence encoding HBP should be operably connected to a suitable promoter sequence. The promoter may be any nucleic acid sequence which shows transcriptional activity in the host cell of choice and may be derived from genes encoding proteins either homologous or heterologous to the host cell. Examples of suitable promoters for directing the transcription of the nucleic acid sequence encoding HBP in mammalian cells are the SV 40 promoter (Subramani et al., Mol. Cell Biol. 1, 1981, pp. 854-864), the MT-1 (metallothionein gene) promoter (Palmiter et al., Science 222, 1983, pp. 809-814) or the adenovirus 2 major late promoter, a Rous sarcoma virus (RSV) promoter, cytomegalovirus (CMV) promoter (Boshart et al., 1981, Cell 41:521-530) and a bovine papilloma virus promoter (BPV). A suitable promoter for use in insect cells is the polyhedrin promoter (Vasuvedan et al., FEBS Lett. 311, 1992, pp. 7-11).

Examples of suitable promoters for directing the transcription of the nucleic acid sequence encoding HBP, especially in a bacterial host cell, are the promoters obtained from the E. coli lac operon, the Streptomyces coelicolor agarase gene (dagA), the Bacillus subtilis levansu-



- crase gene (sacB), the *Bacillus licheniformis* alpha-amylase gene (amyL), the *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase gene (amyM), the *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase gene (amyQ), the *Bacillus licheniformis* penicillinase gene (penP), the *Bacillus subtilis* xylA and xylB genes, and the prokaryotic beta-lactamase gene (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3727-3731), as well as the tac promoter (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21 25). Further promoters are described in "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94; and in Sambrook et al., 1989, supra.
- 10 Examples of suitable promoters for directing the transcription of the nucleic acid sequence encoding HBP in a filamentous fungal host cell are promoters obtained from the genes encoding *Aspergillus oryzae* TAKA amylase, *Rhizomucor miehei* aspartic proteinase, *Aspergillus niger* neutral alpha-amylase, *Aspergillus niger* acid stable alpha-amylase, *Aspergillus niger* or *Aspergillus awamori* glucoamylase (glaA), *Rhizomucor miehei* lipase, *Aspergillus*
- 15 *oryzae* alkaline protease, *Aspergillus oryzae* triose phosphate isomerase, *Aspergillus nidulans* acetamidase, *Fusarium oxysporum* trypsin-like protease (as described in U.S. Patent No. 4,288,627, which is incorporated herein by reference), and hybrids thereof. Particularly preferred promoters for use in filamentous fungal host cells are the TAKA amylase, NA2-tpi (a hybrid of the promoters from the genes encoding *Aspergillus niger* neutral a amylase and *As-*
- 20 *pergillus oryzae* triose phosphate isomerase), and glaA promoters.
1. In a yeast host, useful promoters are obtained from the *Saccharomyces cerevisiae* enolase (ENO-1) gene, the *Saccharomyces cerevisiae* galactokinase gene (GAL1), the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes
- 25 (ADH2/GAP), and the *Saccharomyces cerevisiae* 3-phosphoglycerate kinase gene. Other useful promoters for yeast host cells are described by Romanos et al., 1992, Yeast 8:423-488.

The nucleic acid sequences encoding SEQ ID NOS: 1 and 2, e.g., SEQ ID NOS:3 and 9 may be operably linked to a nucleic acid encoding a heterologous pro sequence. The nucleic acid

30 encoding SEQ ID NOS:6, 8, 10, and 12, e.g., SEQ ID NOS:5, 7, 9, and 11 and may be operably linked to a nucleic acid sequence encoding a heterologous signal sequence and/or pro sequence.





The nucleic acid sequence encoding HBP may also be operably connected to a suitable terminator, such as the human growth hormone terminator (Palmiter et al., op. cit.) Preferred terminators for filamentous fungal host cells are obtained from the genes encoding *Aspergillus*  
5 *oryzae* TAKA amylase, *Aspergillus niger* glucoamylase, *Aspergillus nidulans* anthranilate synthase, *Aspergillus niger* alpha-glucosidase, and *Fusarium oxysporum* trypsin-like protease.

Preferred terminators for yeast host cells are obtained from the genes encoding *Saccharomyces cerevisiae* enolase, *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome C (CYC1), or *Saccharomyces*  
10 *cerevisiae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Other useful terminators for yeast host cells are described by Romanos et al., 1992, supra.

The vector may further comprise elements such as polyadenylation signals (e.g. from SV 40 or the adenovirus 5 Elb region), transcriptional enhancer sequences (e.g. the SV 40 enhancer)  
15 and translational enhancer sequences (e.g. the ones encoding adenovirus VA RNAs). Furthermore, preferred polyadenylation sequences for filamentous fungal host cells are obtained from the genes encoding *Aspergillus oryzae* TAKA amylase, *Aspergillus niger* glucoamylase, *Aspergillus nidulans* anthranilate synthase, and *Aspergillus niger* alpha-glucosidase. Useful polyadenylation sequences for yeast host cells are described by Guo and Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15:5983-5990.  
20

The recombinant expression vector may further comprise a DNA sequence enabling the vector to replicate in the host cell in question. Examples of such a sequence (when the host cell is a mammalian cell) is the SV 40 or polyoma origin of replication. Examples of bacterial origins  
25 of replication are the origins of replication of plasmids pBR322, pUC19, pACYC177, pACYC184, pUB110, pE194, pTA1060, and pAM $\beta$ 1. Examples of origin of replications for use in a yeast host cell are the 2 micron origin of replication, the combination of CEN6 and ARS4, and the combination of CEN3 and ARS1. The origin of replication may be one having a mutation to make its function temperature-sensitive in the host cell (see, e.g., Ehrlich, 1978,  
30 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1433).



- The vector may also comprise a selectable marker, e.g., a gene the product of which complements a defect in the host cell, such as the gene coding for dihydrofolate reductase (DHFR) or one which confers resistance to a drug, e.g., neomycin, geneticin, ampicillin, or hygromycin. Suitable markers for yeast host cells are ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, and
- 5 URA3. A selectable marker for use in a filamentous fungal host cell may be selected from the group including, but not limited to, amdS (acetamidase), argB (ornithine carbamoyltransferase), bar (phosphinothricin acetyltransferase), hygB (hygromycin phosphotransferase), niaD (nitrate reductase), pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase), sC (sulfate adenylation transferase), trpC (anthranilate synthase), and glufosinate resistance markers, as well as
- 10 equivalents from other species. Preferred for use in an *Aspergillus* cell are the amdS and pyrG markers of *Aspergillus nidulans* or *Aspergillus oryzae* and the bar marker of *Streptomyces hygroscopicus*. Furthermore, selection may be accomplished by co transformation, e.g., as described in WO 91/17243, where the selectable marker is on a separate vector.
- 15 The procedures used to ligate the nucleic acid sequences coding for HBP, the promoter and the terminator, respectively, and to insert them into suitable vectors containing the information necessary for replication, are well known to persons skilled in the art (cf., for instance, Sambrook et al., op.cit.).
- 20 The host cell into which the expression vector is introduced may be any cell which is capable of producing HBP and is preferably a eukaryotic cell, such as invertebrate (insect) cells or vertebrate cells, e.g., *Xenopus laevis* oocytes or mammalian cells, in particular insect and mammalian cells. Examples of suitable mammalian cell lines are the COS (e.g., ATCC CRL 1650), BHK (e.g., ATCC CRL 1632, ATCC CCL 10) or CHO (e.g., ATCC CCL 61) cell
- 25 lines.
- The host cell may be a mammalian basophilic cell or mammalian hybrid cell. The mammalian basophilic cell may be human, guinea pig, rabbit or rat basophilic cells. In a specific embodiment, the mammalian basophilic cell is a rat basophilic cell. In a most specific embodiment, the rat basophilic cell may be an RBL-1 cell having the identifying characteristics of
- 30 ATCC CRL-1378 or RBL-2H3 cell having the identifying characteristics of ATCC CRL 2256.



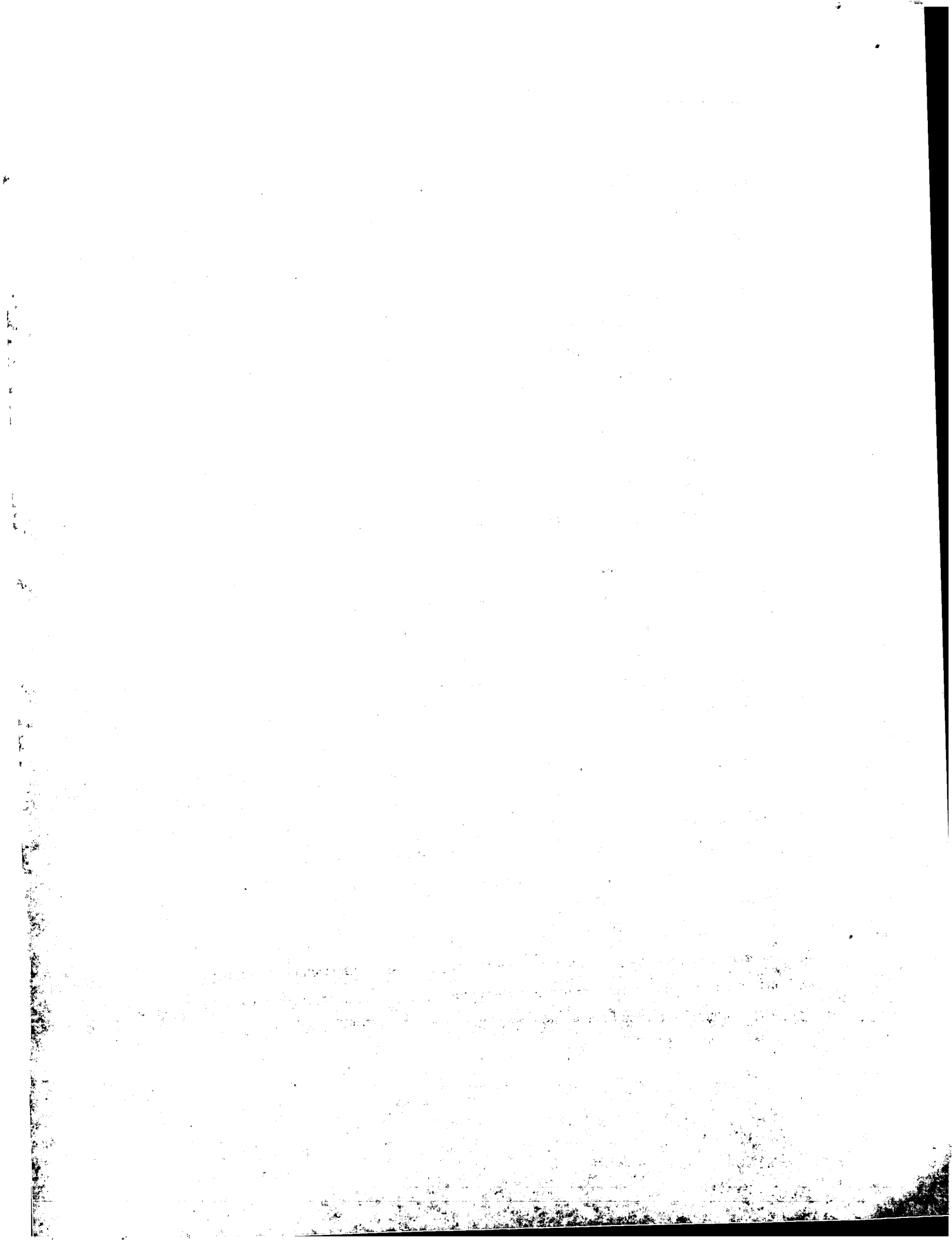
Methods for transfecting mammalian cells and expressing DNA sequences introduced in the cells are described in e.g., Kaufman and Sharp, 1982, J. Mol. Biol. 159:601-621; Southern and Berg, 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341; Loyter et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:422-426; Wigler et al., 1978, Cell 14:725; Corsaro and Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7:603; Graham and van der Eb, 1973, Virology 52:456; Fraley et al., 1980, JBC 225:10431; Capecchi, 1980, Cell 22:479; Wiberg et al., 1983, NAR 11:7287; and Neumann et al., 1982, EMBO J. 1:841-845. In a specific embodiment, the mammalian basophilic cell is transfected with DNA encoding HBP using an electroporation apparatus.

10

The medium used to culture the cells may be any conventional medium suitable for growing mammalian cells, such as a serum-containing or serum-free medium containing appropriate supplements, or a suitable medium for growing mammalian cells. Suitable media are available from commercial suppliers or may be prepared according to published recipes (e.g. in catalogues of the American Type Culture Collection). The cells are then screened for antibiotic resistance. Subsequently, the selected clones are subsequently assayed for HBP activity using assays known in the art such as a chemotaxis assay and assaying for cytokine release from monocytes (see, for example, Rasmussen et al., 1996, FEBS Lett. 390:109-112).

Alternatively, the host cell may be a hybrid mammalian cell. A myeloma line e.g., mouse, rat, human) is transfected with DNA encoding HBP using the procedures described above. It may be subsequently be fused with a mammalian cell expressing an acidic proteoglycan such as a mammalian basophilic cell or mast cell using the following procedures. In one embodiment the parental cells are mixed in culture media such as RPMI-1640 and exposed to a chemical fusion agent such as polyethylene glycol (see, for example, Gefter et al., 1997, Somat. Cell Genet. 3:231-236). The fusion agent is subsequently diluted out and the cells are incubated in media and HAT. Selected clones are subsequently assayed for HBP activity as described above.

Alternatively, two parental cells may be fused by electrofusion. Membrane contact between cells are achieved by a non-uniform alternating field that leads to dielectrophoresis and cell chain formation. Fusion is then triggered by the injection of a field pulse that is strong



enough to induce reversible breakdown in the membrane contact zone (see, for example, Okada et al., 1984, Biomed. Res. 5:511-566). Alternatively cell fusion may be induced by Sendai virus (see, for example, Wainberg et al., 1973, J. Cell Biol. 57:388-396).

- 5 The host cell may be a unicellular pathogen, e.g., a prokaryote, or a non-unicellular pathogen, e.g., a eukaryote. Useful unicellular cells are bacterial cells such as gram positive bacteria including, but not limited to, a *Bacillus* cell, e.g., *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amylolique-*  
10 *faciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus len-*  
*tus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus sub-*  
*tilis*, and *Bacillus thuringiensis*; or a *Streptomyces* cell, e.g., *Streptomyces lividans* or *Strep-*  
*tomyces murinus*, or gram negative bacteria such as *E. coli* and *Pseudomonas* sp. In a pre-  
ferred embodiment, the bacterial host cell is a *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*  
*stearothermophilus* or *Bacillus subtilis* cell. The transformation of a bacterial host cell may,  
for instance, be effected by protoplast transformation (see, e.g., Chang and Cohen, 1979, Mo-  
15 lecular General Genetics 168:111-115), by using competent cells (see, e.g., Young and Spiz-  
izin, 1961, Journal of Bacteriology 81:823-829, or Dubnar and Davidoff Abelson, 1971, Jour-  
nal of Molecular Biology 56:209-221), by electroporation (see, e.g., Shigekawa and Dower,  
1988, Biotechniques 6:742-751), or by conjugation (see, e.g., Koehler and Thorne, 1987,  
Journal of Bacteriology 169:5771-5278).

20

- The host cell may be a fungal cell. "Fungi" as used herein includes the phyla Ascomycota,  
Basidiomycota, Chytridiomycota, and Zygomycota (as defined by Hawksworth et al., In,  
Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, Uni-  
versity Press, Cambridge, UK) as well as the Oomycota (as cited in Hawksworth et al., 1995,  
25 supra, page 171) and all mitosporic fungi (Hawksworth et al., 1995, supra). Representative  
groups of Ascomycota include, e.g., *Neurospora*, *Eupenicillium* (=Penicillium), *Emericella*  
(=Aspergillus), *Eurotium* (=Aspergillus), and the true yeasts listed above. Examples of  
Basidiomycota include mushrooms, rusts, and smuts. Representative groups of Chytridiomy-  
cota include, e.g., *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces*, and aquatic fungi. Represen-  
30 tative groups of Oomycota include, e.g., Saprolegniomycetous aquatic fungi (water molds)  
such as *Achlya*. Examples of mitosporic fungi include *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, and  
*Alternaria*. Representative groups of Zygomycota include, e.g., *Rhizopus* and *Mucor*.





- In a preferred embodiment, the fungal host cell is a yeast cell. "Yeast" as used herein includes ascosporogenous yeast (Endomycetales), basidiosporogenous yeast, and yeast belonging to the Fungi Imperfecti (Blastomycetes). The ascosporogenous yeasts are divided into the families
- 5    families Spermophthoraceae and Saccharomycetaceae. The latter is comprised of four subfamilies, Schizosaccharomycoideae (e.g., genus Schizosaccharomyces), Nadsonioideae, Lipomycoideae, and Saccharomycoideae (e.g., genera Pichia, Kluyveromyces and Saccharomyces). The basidiosporogenous yeasts include the genera Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus, Filobasidium, and Filobasidiella. Yeast belonging to the Fungi Imperfecti are
- 10    divided into two families, Sporobolomycetaceae (e.g., genera Sporobolomyces and Bullera) and Cryptococcaceae (e.g., genus Candida). Since the classification of yeast may change in the future, for the purposes of this invention, yeast shall be defined as described in Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980). The biology of yeast and manipulation of yeast
- 15    genetics are well known in the art (see, e.g., Biochemistry and Genetics of Yeast, Bacil, M., Horecker, B.J., and Stopani, A.O.M., editors, 2nd edition, 1987; The Yeasts, Rose, A.H., and Harrison, J.S., editors, 2nd edition, 1987; and The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Strathern et al., editors, 1981).
- 20    In a more preferred embodiment, the yeast host cell is a cell of a species of Candida, Kluyveromyces, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Pichia, or Yarrowia. In a most preferred embodiment, the yeast host cell is a Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces norbensis or Saccharomyces oviformis cell. In another most preferred embodiment, the
- 25    yeast host cell is a Kluyveromyces lactis cell. In another most preferred embodiment, the yeast host cell is a Yarrowia lipolytica cell.

- The medium used to culture the cells may be any conventional medium suitable for growing mammalian cells, such as a serum-containing or serum-free medium containing appropriate
- 30    supplements, or a suitable medium for growing insect, yeast or fungal cells. Suitable media are available from commercial suppliers or may be prepared according to published recipes (e.g., in catalogues of the American Type Culture Collection).



The HBP produced by the cells may then be recovered from the culture medium by conventional procedures including separating the host cells from the medium by centrifugation or filtration, precipitating the proteinaceous components of the supernatant or filtrate by means of a salt, e.g., ammonium sulphate, purification by a variety of chromatographic procedures, e.g., ion exchange chromatography, affinity chromatography, or the like. The recombinant host cells may also produce an acid proteoglycan such as heparin sulfate. To obtain active HBP, the acid proteoglycan will need to be removed. This may be accomplished using a series of separation methods, ie., precipitation or column chromatography, such as reverse phase HPLC, HIC, SEC, IEC and affinity based techniques. The separation method may be combined with other treatments like increasing salt concentration, by change in the pH and by other means that reduce interactions between the acidic proteoglycan and HBP.

The recombinant host cells may also produce an acid proteoglycan such as heparin sulfate. To obtain active HBP, the acid proteoglycan will need to be removed.

## COMPOSITIONS

In the pharmaceutical composition used in the method of the present invention, the HBP may be formulated by any of the established methods of formulating pharmaceutical compositions, e.g. as described in Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985. The composition may typically be in a form suited for local or systemic injection or infusion and may, as such, be formulated with sterile water or an isotonic saline or glucose solution. The compositions may be sterilized by conventional sterilization techniques which are well known in the art. The resulting aqueous solutions may be packaged for use or filtered under aseptic conditions and lyophilized, the lyophilized preparation being combined with the sterile aqueous solution prior to administration. The composition may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as buffering agents, tonicity adjusting agents and the like, for instance sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, etc. The concentration of HBP may vary widely, i.e. from less than about 0.5%, such as from 1%, to as much as 15-20% by weight. A unit dosage of the composition may typically contain from about 10 mg to about 1 g of HBP.



HBP or pharmaceutically active fragments thereof are administered topically or by intravenous injection. Dosages will be prescribed by the physician according to the particular condition and the particular individual to be treated. Dosages and frequency is carefully adapted and adjusted according to parameters determined by the physician in charge. A preferred administration route may be e.g. injections intraperitoneally. Intravenous intraperitoneal injections of HBP may be given per 24 hours in the range of from 0.1-100 mg, especially 0.1-20 mg, in particular 0.1-10 mg per kg body weight. The dose may be given 1-4 times per 24 hours or administered continuously through a catheter.

10

Compositions used in the present invention may additionally comprise a mitochondrial matrix targeting protein. In a specific embodiment, the mitochondrial matrix targeting protein has a molecular weight of about 33 kD, binds to H- but not L-kininogen. In a more specific embodiment, the mitochondrial matrix targeting protein has an N-terminal amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:15, the 32 N-terminal amino acid sequence of p33 (Ghebrehwet et al., 1994, J. Exp. Med. 179: 1809):

MLPLLRCVPRVLGSSVAGLRAAAPASFRQLL (SEQ ID NO:15)

20 In a most specific embodiment the mitochondrial matrix targeting protein is the zinc dependent p33 protein depicted in SEQ ID NO:16:

MLPLLRCVPRVLGSSVAGLRAAAPASFRQLLQPAPRLCTRPFGLLSVRAGSERRPGL  
LRPRGPCACGCGCSLHTDGDKAFVDFLSDEIKEERKIQKHKTLPKMSGGWELELNG  
25 TEAKLVRKVAGEKITVTFNINNSIPPTFDGEEPSQGQKVEEQPELTSTPNFVVEVIK  
NDDGKKALVLDCHYPEDEVGQEDAESEDFSIRESFQSTGSEWKDTNYTLNTDSLWD  
ALYDHLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEHQEYITFLEDLKSFKVSQ (SEQ ID  
NO:16)

30 Compositions used in the methods of the present invention are contemplated to be of use in treating or preventing disorders caused by apoptosis. These include but are not limited to



HIV, neurodegenerative or neuromuscular diseases, ischemic stroke, anoxia, ischemia/reperfusion damage and intoxication septic shock.

5 In a specific embodiment, said compositions may be used to prevent the destruction of beta cells in the Islets of Langerhans in the pancreas. Damage to such beta cells leads to diabetes mellitus.

## EXAMPLES

### 10 Example 1: Treatment of Beta Cells with HBP

#### Production of HBP

HBP is obtained from RBL-1 cells using the procedure described in application serial no.  
15 PCT/DK98/00275. The procedure is summarized below.

#### Materials

The vectors pBlueBacIII and pcDNA3 are obtained from Invitrogen. All primers and oligos  
20 are synthesized on an Applied Biosystems Model 394 DNA synthesizer. Restriction enzymes are obtained from New England Biolabs. Pfu polymerase, used in PCR reactions is obtained from Stratagene. RBL-1 cells (ATCC CRL-1378) and RBL-2H3 cells (ATCC CRL-2256) are obtained from American Type Culture Collection (ATCC) in Manassas, VA. Cells are grown as recommended by the supplier or in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Life Technologies)  
25 supplemented with 10% heat inactivated gamma- irradiated FCS (origin: NZ, Gibco, Life Technologies) or fetal calf serum (FCS) North American origin from HyClone or BioWhittaker. Cells are grown in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in an 80% humidified atmosphere. Exponentially growing cells are used in all experiments.

### 30 Construction of Expression Vectors

A 770 bp BamHI-HindIII fragment is constructed using PCR technology from a human bone marrow DNA library (Clontech) based on the human HBP amino acid sequence (Flodgaard et





al., 1991, Eur. J. Biochem. 197:535-547) and the CAP 37/azurocidin DNA sequence (Morgan et al., 1991, J. Immunol. 147:3210-3214 and Almeida et al., 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177:688-695). This fragment contains the entire coding region of HBP, including a 19-residue signal peptide, a 7 amino acid pro-peptide, a mature part of 22 amino acids, and a 3 amino acid C-terminal extension. The fragment is inserted into pBlue-BacIII resulting in the plasmid pSX556. For deletion of the pro-region, an oligonucleotide linker of 99 bp, covering the signal peptide and the first 4 amino acids of mature HBP (from BamHI to EagI) is substituted for the original BamHI-EagI fragment in pSX556 giving rise to pSX559.

- 10 For expression of these two cDNA sequences in RBL-1 cells, pSX556 and pSX559 described above are used as templates in PCR reactions using the primers  
PBRa 246 (5'-CCGGGGATCCAACTAGGCTGGCCCCGGTCCCGG-3') (SEQ ID NO:13)  
PBRa247 (5'-CCGGGGATCCGATGACCCGGCTGACAGTCCTGG-3') (SEQ ID NO:14)  
with a Pfu polymerase according to manufacturer's instructions (Stratagene).

15

After *Bam*HI cleavage of the PCR reaction products, the fragments are ligated in correct orientation into the mammalian expression vector pcDNA3 (Invitrogen), linearized with *Bam*HI, resulting in two plasmids, pcDNA3-HBP and pcDNA3-HBP pro.

## 20 Transfection Procedures

- Transfection is performed according to the following procedures. 25 µg of pcDNA3-HBP or pcDNA3-HBP pro is transfected into RBL-1 cells or RBL-2H3 cells ( $8 \times 10^6$  cells are transfected using a BioRad Electroporation Apparatus with electric settings 960 uF and 300V as described by Gullberg et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:25219-25225 and Garwicz et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:28413-28418, or are transfected using LipofecAmine (Gibco, Life Technologies) or Superfect (Qiagen) transfection reagents as recommended by the suppliers. Cells are grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated gamma irradiated FCS in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in an 80% humidified atmosphere. Geneticin (2 mg/ml) is added 48 hrs. post-transfection to select for recombinant clones.



Individual clones growing in the presence of geneticin are isolated and tested for HBP expression by ELISA. The HBP ELISA is a sandwich immunoassay using a monoclonal antibody as catcher and a polyclonal rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase as detector. Antibodies are prepared according to standard procedures by immunizing mice and rabbits  
5 with HBP purified from human buffy coat cells (Flodgaard et al., 1991, Eur. J. Biochem. 197:535-547). Specifically, each well is coated with 0.5 µg monoclonal anti-hHBP dissolved in 100 µl of PBS overnight. The coated wells are washed three times with a solution of 5% lactose, 0.5% Byco A 0.05% Tween 20 and 0.024% thiomersal. After the last washing, the plates are left to dry at room temperature upside-down on a piece of cloth. The coated plates  
10 are capped with staniol and can be stored up to three months.

Purified hHBP is used as reference preparation. A working dilution of 100 ng hHBP/ml is prepared in a BSA-EDTA buffer and stored in aliquots at -80°C for a maximum of two weeks. Serial dilution's containing 0; 0.3; 1; 4 and 12 ng hHBP/ml diluted in BSA-EDTA are made  
15 fresh and 100 µl are added to each well. hHBP samples are also diluted in BSA-EDTA buffer and all the samples are in-cubated agitated for 1 hour at room temperature. The wells are emptied and washed three times with phosphate buffered saline followed by the addition of 100 µl/well diluted (1:1000) Fab-peroxidase conjugated rabbit anti-hHBP, and incubated agitated for 1 hour at room temperature. Peroxidase activity is measured using 100 µl/well TMB  
20 perborate substrate solution, resulting in a color formation measurable photometrically at 450 nm. The reference curve is linear when the logarithm to the absorbance is plotted against the logarithm to the dose.

Clones with the most pronounced expression are chosen for further experiments, recloned and  
25 retested for expression levels. The highest HBP producers are selected and grown into mass culture or adapted to serum free or protein free medium.

### Isolation of HBP

30 The isolation of HBP from RBL-1 cells is carried out essentially as described by Rasmussen et al., 1996, FEBS Lett. 390:109-112. The transfected and selected RBL-1 cells are initially filtered to remove any remaining cells and cell debris. The culture medium is subsequently



applied to a CM-Sepharose cation-exchange column (Pharmacia and Upjohn), previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate, pH 7.3. Unbound and loosely bound materials are eluted with equilibration buffer until baseline is achieved measured by on-line UV detection at 280 nm. The column is then developed with a linear gradient from 0 to 1 M sodium chloride in equilibration buffer. HBP eluted with about 0.7 M sodium chloride and fractions are combined based on UV absorption. Pooled fractions are diluted with two volumes of distilled water and applied on a new CM-Sepharose column. Following equilibration HBP is step eluted with 1 M sodium chloride in equilibration buffer and fractions combined based on absorption at 280 nm. Highly concentrated and pure HBP is obtained by this procedure. Final purification is carried out on a Sephadex G-25 gel-filtration column (Pharmacia & Upjohn) equipped with a UV-flow cell and equilibrated and eluted with 0.02% trifluoroacetic acid. HBP is collected based on absorption at 280 nm. The gel filtration serves mainly as a buffer exchange step to produce a stable preparation of HBP that is kept at 4°C until use.

#### 15 **HBP Rescues Beta Cells from Cytokine Induced Apoptosis**

The following protocol is used:

Day 0: Rat Insulinoma cells (RIN cells) are seeded in 200 µl medium with 10,000 cells per well. Day 1: After 24 hours the medium is discarded and new medium containing 0, 20 or 50 µg/ml medium of HBP is added to a total volume of 100 µl. Day 2: The medium in the wells without HBP is discarded and fresh medium containing 0 or 1500 units IL-1 beta and 20 µg/ml medium of HBP is added in a total volume of 200 µl. To the wells pretreated with HBP (cells not attached) 0 or 1500 units IL-1 Beta and 20 µg/ml medium of HBP is added in a total volume of 100 µl giving a total volume of 200 µl. Day 5: The NO content in the medium and the accumulation of insulin are measured. MTT assay (succinate dehydrogenase activity, a measure of apoptosis) is performed on the cells.

The results are shown in Figures 1 and 2. The numbers 1-6 depict the following: 1: Control (all media changed after preincub. with HBP, 200 µl new media with HBP and cytokines added; 2: as 1 but with 20 µg/ml HBP; 3: as 1 but with 50 µg/ml HBP; 4: Control (100 ml media (with HBP and 2x cytokines) added on top of 100 µl HBP preincubation; 5: as 4 but



with 20 µg/ml HBP; 6: as 4 but with 50 µg/ml HBP. It is evident from the results that treatment of beta cells with HBP results in a decreased apoptosis, but no effect on NO production.

#### **Effect of HBP on Streptozotocin Treated Cells**

5

Beta cells are pre-incubated with HBP or control vehicle for 24 hours before treatment with varying concentrations of the NO donor, Streptozotocin. After 1-2 days of incubation at standard conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) cells are assayed for apoptosis. The cells pre-incubated with HBP show less or no apoptosis as compared to control incubations. Thus, HBP prevents destruction of the beta cells.

10

Beta cells are incubated with HBP and Streptozotocin or control vehicle and Streptozotocin for 24 hours. The cells incubated with HBP show less or no apoptosis as compared to control incubations. Thus, HBP prevents destruction of the beta cells.

15

#### **Animal Studies**

Wistar adult rats are pre-treated with a sustained release of HBP or control vehicle from a subcutaneously implanted mini osmotic pump on the back. 24 or 48 hours later, the rats are rendered diabetic by intraperitoneal injection of Streptozotocin in the tail. Blood glucose and urinary excretion of glucose and albumin are monitored for 2-3 weeks. The HBP treated rats show a significant lower frequency of diabetes symptoms than the controls. Finally, the animals are sacrificed and histological examination of the pancreas is performed. The HBP treated rats show no or little beta cell destruction.

25

Spontaneously diabetic NOD (nonobese diabetic) mice are treated with HBP or control vehicle for 1-2 months. The HBP treated mice show a significant lower frequency of diabetes symptoms than the controls. Finally, the animals are sacrificed and histological examination of the pancreas is performed. The HBP treated mice show no or little beta cell destruction.

30

Three month old obese Zucker rats and age-matched lean rats are treated for 1 month with HBP by subcutaneously infusion using mini-osmotic pumps delivering 0.05 mg/kg body





weight per 24 hours. After 1 month the animals are sacrificed and the pancreas assessed for damage of Islets of Langerhans by histological techniques known to the person skilled in the art.

## 5 **Example 2: HBP is Internalized and Targeted to the Mitochondrial Compartment**

### **Experimental procedures**

#### **Cell culture**

10

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) are isolated by digestion with collagenase (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA) and cultured on gelatinized (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) surfaces in the presence of fetal calf serum (ICN Biochemicals Inc., Costa Mesa, Ca, USA), calf serum (ICN Biochemicals Inc.) endothelial cell growth factor  
15 (Sigma), heparin (Sigma) and antibiotics (Gibco BRL, Paisley, Scotland) in M199 with Earle's salt (GIBCO) (Jaffe et al., 1973, J. Clin. Invest. 52:2745-2756 and Thornton et al., 1983, Science 222:623-625). The primary cultures are passed only once using trypsin-EDTA. The cells are used when expressing cobblestone morphology except for microscopical studies when subconfluent cells are used.

20

Wildtype CHO cells (CHO-K1) and the heparan sulfate deficient variant (pgsD-677) (Murphy Ulrich et al., 1988, J. Biol. Chem. 272:24363-243670). are grown in F12K Nutrient mixture with Kaighn's modification (GIBCO) supplemented with fetal calf serum and antibiotics.

25

White 96 well tissue culture plates, CulturePlates™, Microscint-PS scintillation fluid and the microplate scintillation counter Topcount™ is obtained from Packard, Meriden, USA. Standard 96 well tissue culture plates are obtained from Nunc, Denmark. Fetal calf serum (FCS) is obtained from Gibco BRL. Hydrogen peroxide is obtained from Merck. Formaldehyde and Triton X-100 is obtained from Sigma.

30

#### **Antibodies and proteins**



Recombinant human HBP is produced using a baculovirus expression system in Sf9 insect cells (BRL) and purified as described (Rasmussen et al., 1996, FEBS Lett. 390:109-112). The mouse monoclonal antibody (mab) 2F23C3 and rabbit antisera against recombinant HBP (anti-HBP) were affinity-purified. The antiserum against mitochondrial protein p33/gC1qR (anti-p33) was raised in rabbits and affinity-purified (Dedio et al., 1998, J. Immunol 160:3534-3542). The mouse mab 3G10 recognizing desaturated glucuronate reactive with heparitinase-digested heparan sulfate proteoglycan core proteins has been characterized previously (David et al., 1992, J. Cell Biol. 119:961-975). Texas red-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin IgG and goat anti-mouse IgG are from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA); peroxidase-conjugated antibodies against rabbit IgG from Bio-Rad (Richmond, CA, USA); and alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse antibodies from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Biotinylation of purified HBP is performed.

#### 15 **Metabolic labeling of endothelial cells**

Endothelial cells are cultured in the presence of 100 mCi/ml  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  (specific activity) (Amersham International, Buckinghamshire, UK) or 50 mCi/ml  $^3\text{H}$  leucine (Amersham) diluted in endothelial cell culture media. After 24 hours, the cells are washed 4 times with cold phosphate buffered saline (PBS, GIBCO) and lysed for 1 hour at 4°C on a shaker. The lysis buffer consisted of 1% Triton-X-100, 20 mM Tris-HCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM PMSF, 5 mM 1,10-phenanthroline, 4 mg/ml leupeptin, 4 mg/ml pepstatin A and 100 mg/ml aprotinin at pH 8.0. The lysate is centrifuged at 10,000 g for 30 minutes at 4°C and the pellet is discarded.

25

#### **Affinity chromatography on HBP Sepharose**

The endothelial cell lysate, containing 0.2 M NaCl, is incubated end over end with DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with 0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% Triton-X-100 and 1 mM PMSF at pH 8.0. After 1 h at 4°C the DEAE-Sepharose is washed with 10 gel volumes of 0.2 M NaCl, 50 mM Na-acetate, 0.1% Triton-X-100, 1 mM PMSF at pH 4.0 and then eluted with 1 M NaCl in buffer A (20 mM Tris HCl, 0.1% Triton-X-100 and 1 mM PMSF at pH 7.4).



Biotinylated HBP (5 mg) is bound to 2.5 ml streptavidin-agarose (Sigma). Uncoupled agarose is used as a control column. Successful coupling of HBP to the column is confirmed by SDS PAGE (data not shown). Equal gel volumes of the HBP- and control agarose are equilibrated at 4°C with buffer A containing 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub>. The material eluted from the DEAE-Sepharose is dialyzed against equilibration buffer, incubated end over end with the control column for 2 h at 4°C followed by the HBP-column for 2 h at 4°C. The HBP- and control columns are washed with 10 gel volumes of equilibration buffer and then eluted with 5 gel volumes each of a discontinuous NaCl gradient ranging from 250 to 1000 mM NaCl in buffer A. Samples from eluted material are separated by 4-16% SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions. Analysis of radioactive material is done on gels exposed to X-ray film or to Fuji Imaging plates (BioImaging Analyzer Bas2000, Fuji Photo Film Co., LTD, Tokyo, Japan). When the samples contained <sup>3</sup>H-leucine-labeled material, gels are treated with 1.3 M Na-salicylate in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 7 (Chamberlain, 1979, Anal. Biochem. 98:132-135) prior to exposure to X-ray film.

#### Enzymatic and Chemical Digestion of Proteoglycans

Radiolabeled HBP-binding material eluted from the HBP-streptavidin agarose is treated overnight at room temperature with either 60 mU/ml CABC (Sigma), 4 U/ml heparinase III (Sigma), or a combination of both in 50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl at pH 7.3. In order to cleave heparan sulfate, the samples are treated with HNO<sub>3</sub> at pH 1.5 for 10 min at room temperature (Shively and Conrad, 1976, Biochemistry 15:3932-3942). Proteoglycans can be separated based on their size in agarose gels where they run as discrete units rather than as a broad smear (Bjornsson, 1993, Anal. Chem. 210:282-291 and Bjornsson, 1993, Anal. Chem. 210:292-298). Some treated samples are separated on 1.2 % agarose gels whereas others are separated on 4-16% SDS-PAGE. The dried gels are exposed to Fuji Imaging plates.

#### Western blotting of proteoglycans

The HBP-affinity purified material is concentrated on 100 ml DEAE-Trisacryl columns (BioSeptra S.A., Villeneuve la Garenne Cedex, France) and eluted with buffer A containing 1 M NaCl (5 x 50 ml). The concentrated samples and the sample from the original endothelial



cell lysate are doubly digested with 0.5 U/ml CABC (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) and 10 mU/ml heparitinase (Seikagaku) in 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X-100, 50 mM 6-amino-hexanoic acid, 20 mg/ml leupeptin, 2.5 mg/ml pepstatin A, 1 mM PMSF and 50 mM HEPES at pH 7.0, for 3 hours at 37°C. After separation under non-reducing conditions by 20% SDS-PAGE, materials are transferred onto Zeta-Probe membranes (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) at 70 V, 0.5 mA for 4 hours at 4°C. The membranes are blocked in 0.5% casein in PBS (buffer B) containing 0.6 M NaCl over night at 4°C followed by incubation for 1 hour at room temperature with mouse mAb 3G10, diluted in buffer B containing 0.15 mM NaCl. After two washes with buffer B containing 0.6 M NaCl, the membranes are washed once in buffer B containing 0.15 M NaCl and then incubated with rabbit anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase diluted 1:5000 in buffer B containing 0.15 M NaCl. After two washes, bound antibodies are detected using the CSPD detection system (Tropix, Bedford, MA, USA) according to the manufacturer.

#### 15 Western blotting of p33

Protein samples eluted from the HBP-coupled column are separated by 12.5 % SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes for 30 min at 100 mA. The membranes are blocked with 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M NaCl, containing 5% w/v dry milk powder and 0.05% w/v Tween 20 at pH 7.4 (buffer C). Transferred proteins are incubated with primary antibodies (anti-rp33, anti-CDR31, anti-MBP, anti-HBP) diluted to 1 mg/ml in buffer C. Bound primary antibodies are detected by a peroxidase-conjugated secondary antibody against rabbit IgG followed by the ECL (Amersham) detection method.

#### 25 Indirect ELISA

Microtiter plates are coated overnight at room temperature with HBP, H-kininogen or a control peptide KLH (1 mg/ml each) in 100 mM sodium acetate and 100 mM NaCl at pH 5.5 (Herwald et al., op. Cit.). Binding of the recombinant fusion protein rp33 or the fusion partner MBP (starting concentration 2 mg/ml, two fold dilutions) to the immobilized proteins is detected by a-MBP (1:2500 v/v) followed by incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody directed against rabbit IgG (1:3000 v/v) (Herwald et al., op. cit). The incubation steps are done in a buffer containing 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M NaCl, containing 2% w/v bovine





serum albumin (BSA) and 0.05% w/v Tween 20 at pH 7.4. For visualization, a substrate solution of 0.15% w/v diammonium 2,2-azino-bis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazoline-6-sulfonate), (ABTS), 0.012 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100 mM citric acid, pH 4.5 is applied for 30 min, and the change in absorbance is determined at 405 nm.

5

#### Measurement of affinity between HBP and p33

Specific interactions between HBP and rp33 are studied using surface plasmon resonance spectroscopy (BIAlite, Pharmacia, Freiburg, Germany). HBP is coupled to a CM5 sensor chip according to the manufacturer's instructions. MBP and rp33 are dissolved in HEPES-Tyrodes buffer in the presence or in the absence of 50  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> in two fold serial dilution, with a starting concentration of 100  $\mu$ g/ml. To follow the association of rp33 and MBP to coupled HBP, 30  $\mu$ l of each protein sample is applied using a flow rate of 10 ml/min. After 3 min, the chip is washed with PBS to follow dissociation for 3 min. The chip is regenerated by washing with 30 mM HCl. To calculate the dissociation constant, the BIAevaluation 2.0 program (Pharmacia, Freiburg, Germany) is used.

#### FACS-analysis

Endothelial cells grown to confluency in 12-well plates are washed once in M199 with Hank's solution (GIBCO) and then incubated with unconjugated recombinant HBP (50  $\mu$ g/ml) diluted in the same media for various periods of time at 37°C. The cells are washed twice with 0.5% human serum albumin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) in PBS and once with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free PBS. Cell dissociation solution (500  $\mu$ l; Sigma) is added, the cells are placed at 37°C for 15 min and then harvested using a cell scraper. After fixation in 1% formaldehyde for a minimum of 1 hour at room temperature, the cells are incubated with a mouse mAb against HBP (25  $\mu$ g/ml) in PBS/0.02% azide containing 1% heat-inactivated human serum or the same solution containing 1% saponin (Sigma) and 0.0125% digitonin (Sigma). Next, the cells are incubated with a FITC-conjugated secondary goat-anti-mouse antibody diluted 1:100. The cells (5,000/experiment) are analyzed on a FACSsort (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) using a FACStation with Cellquest software. The control cells are incubated with

30



either primary or both primary and secondary antibodies but not with HBP. The mean fluorescence intensity (MFI) is calculated on channel values. Results are given as means SD.

In some experiments, the endothelial cells are pretreated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mM), cytochalasin D (1  $\mu\text{M}$ ) or cycloheximide (1 nM) before addition of HBP (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The various substances are present throughout the 30 min incubation with HBP. In other experiments, HBP is incubated with heparin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) prior to addition of the HBP-heparin mixture to the cells. The binding and internalization of HBP to endothelial cells is also investigated at 4°C. Wildtype (CHO-K1) and heparan sulfate proteoglycan deficient CHO cells (pgsD-677) (Murphy-Ulrich et al., op cit.) are treated as described above for endothelial cells and investigated for internalization of HBP.

#### Confocal laser microscopy

Endothelial cells grown overnight on microscopic slides are incubated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FITC labeled or unconjugated HBP in M199 with Hank's solution (GIBCO) for various periods of time. After a brief wash with PBS, the endothelial cells are fixed in 4% formaldehyde for 1 hour. Cells are washed with 100 mM glycine for 1 hour and permeabilized with cold methanol for 10 min. Cells are incubated with 1% BSA in PBS prior to incubation with antibodies. The staining steps are performed so as to avoid crossreactions from secondary reagents.

When FITC-conjugated HBP is used, the cells are incubated up to 24 hours, fixed in formaldehyde and stained for p33. After 30 min incubation with anti-rp33 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), the cells are washed and fixed with a Texas Red-conjugated goat-anti-rabbit IgG. The slides are equilibrated and mounted with SlowFade Antifade (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) according to manufacturer's instructions. The cells are analyzed using a Zeiss LSM 310 (Laser Scan Microscope, Oberkochen, Germany). A 590 nm filter is used to prevent interference of emitted light from the green to the red signal. Horizontal sections of doublestained cells are taken and investigated for colocalization. Colocalization resulted in a color shift from green and red to yellow/orange. In some experiments, the signal from the green channel is subtracted from the red channel thereby yielding black areas representing colocalization.



When unconjugated HBP is used, the fixed cells are incubated with biotinylated rabbit-anti human-HBP antibody (50 mg/ml) for 30 min followed by FITC-conjugated streptavidin (10 mg/ml). Next the cells are incubated with a mouse mAb specific for human mitochondria (mAb 1273) diluted 1:50 followed by incubation with Texas red-conjugated goat-anti-mouse 5 IgG. The cells are mounted and investigated for colocalization as described above.

### Cell Fractionation

Confluent endothelial cells grown in five 12-well plates were washed once in M199 with 10 Hank's solution (GIBCO). Each plate was incubated with non-conjugated recombinant wildtype HBP (25 mg/ml) in 5 ml of the same buffer for 24 h at 37°C. Cells are washed once with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free PBS, and scraped from the plates. After centrifugation (800 x g, 10 min) cells are resuspended in 2.5 ml of 50 mM phosphate, pH 7.4, 0.28 M sucrose, 100 µg/ml phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 0.5 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, 15 3.6 µg/ml trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane. Washed cells are pressurized with  $\text{N}_2$  for 5 min at 350 psi at 4°C and the cavitate is collected. The homogenate is centrifuged at 800 x g for 10 min and the nuclear pellet P1 is discarded. The supernatant (S1) is further analyzed as described earlier Briefly, supernatant S1 is centrifuged at 20,000 x g for 20 min and the resulting supernatant S2 is collected. The membrane pellet P2 is washed in 20 ml of 50 mM phosphate buffer containing proteinase inhibitors and centrifuged again. Washed pellet, P2, is resuspended in 1 ml of phosphate buffer containing 12% (w/v) sucrose and layered on top of a 33% (w/v) sucrose cushion (10 ml) followed by centrifugation carried out at 100,000 x g for 3 h. The pellet P3 (vesicular fraction) was resuspended in phosphate buffer. The membranes at the gradient interface were collected, diluted with 30 ml of phosphate 25 buffer and centrifuged (30,000 x g, 45 min). Pellet P4 (membrane fraction) is resuspended in phosphate buffer. Centrifugation (100,000 x g, 3 h) of supernatant S2 gave pellet P3 (microsomal fraction) and supernatant S3 (cytosolic fraction). All treatments are performed at 4°C.

### 30 Induction of Apoptosis in HUVEC Cells



HUVEC cells are retrieved and subcultured. Cells in passage #1 are trypsinized and seeded (10,000 cells/well in 100 µl complete growth medium) in 96-well CulturePlates, precoated with gelatine. The cells are cultured overnight to obtain confluence. As a visual control, cells are seeded in parallel in a standard 96-well tissue culture plate (Nunc).

5

After culturing overnight, the medium is changed to M199 + 10% FCS, hHBP is added to final concentrations 0, 10 or 50 µg/ml and the cells are incubated for 24 hours. After the preincubation period, apoptosis is induced by simultaneously washing away hHBP and changing the medium to either M199 + 10% FCS or M199 without additives. The cells are subsequently incubated for 24 hours. The DNA fragmentation is measured by the TUNEL as described in the kit sold by PharMingen method with a few modifications. At the end of the assay, culture medium is carefully removed and the cells are fixed by adding 200 µl 10% formaldehyde buffered in PBS (20 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) for 30 min. at room temperature. The cells are washed once with PBS and permeabilized for 5 min. with 100 µl of a mix of 0.1% sodium citrate and 0.1 % Triton X-100 at room temperature, followed by a wash with PBS. The TUNEL reaction is initiated by adding 50 µl of TUNEL reaction mix (5 U Tdt enzyme and 0.3 µl [<sup>32</sup>P]dCTP/well in 200 mM sodium cacodylate, 25 mM Tris-HCl, 1 mM CoCl<sub>2</sub>, 0.25 g/l BSA, pH 6.6), the plate is incubated at 37°C for 1 hr. to determine the background level, wells in parallel are incubated with reaction mix without Tdt enzyme. The reaction is terminated by carefully removing the TUNEL reaction mix and washing the cells twice with PBS. Subsequently, the plate is completely dried under vacuum, 200 µl of Microscint-PS scintillation fluid is added, the plate is sealed and counted in a microplate scintillation counter (Packard TopCount). The degree of labelling is determined by subtracting the background level from the values obtained in the samples containing Tdt enzyme.

25

#### **Effect of HBP on Hydrogen Peroxide Treated HUVEC Cells**

HUVEC cells are treated with medium (control) and medium containing hydrogen peroxide as indicated for 18 hours. Apoptosis is determined as described above.

30

#### **Results**





### Release of HBP from activated human neutrophils

HBP is a protein that is almost exclusively synthesized and stored in polymorphonuclear (PMN) leukocytes. To demonstrate that HBP can be released from these cells, PMN leukocytes are stimulated from human plasma with increasing concentrations of phorbol myristate acetate (PMA) or f-Met-Leu-Phe (fMLP) in the presence or absence of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The agonist-triggered release of HBP was followed by sandwich ELISA and is exemplified for PMA (Figure 3A) and fMLP (Figure 3B). PMA and fMLP does induce HBP secretion from PMNs in a dose-dependent manner. The presence of endothelial cells further increases HBP secretion. Hence human PMNs efficiently secrete HBP upon stimulation by PMA or fMLP in proximity to HUVECs.

### Affinity purification of HBP binding sites

Endothelial cells are metabolically labeled with  $\text{Na}_2[^{35}\text{S}]\text{SO}_4$  to allow incorporation into the glycosaminoglycan chains of proteoglycans. Cells are lysed, the total cellular lysate was applied to DEAE-Sepharose, and the eluted material was affinity-purified on HBP covalently bound to agarose. The radiolabeled material was eluted from the HBP-column by a step gradient of 250 to 500 mM NaCl, and the resultant fractions were analyzed by SDS-PAGE (Figure 4A, left panel). The eluted material appears as a broad smear of bands covering a molecular weight range of approximately 40 kDa to > 400 kDa as often found for proteoglycans whereas minor amounts of unspecifically bound material was eluted from the uncoupled matrix (Figure 4A, right panel). Hence, a heterogeneous population of  $[^{35}\text{S}]$ -labeled molecules sticks to the HBP-Sepharose which may - at least in part - represent proteoglycans; these are referred to HBP binding sites.

### Glucosidase treatment of HBP-binding proteoglycans

Radioactively labeled material from the HBP column was treated with chondroitinase<sub>ABC</sub> ( $\text{C}_{\text{ABC}}$ ) to remove side chains of chondroitin sulfate and dermatan sulfate, or with  $\text{HNO}_2$  to selectively destroy heparan sulfate side chains. The resultant mixtures were electrophoretically separated on agarose gels (Figure 4B). The  $^{35}\text{SO}_4$ -labeled HBP-binding sites were sensitive to



- the treatment with C<sub>ABC</sub> (left panel) or HNO<sub>2</sub> (right panel) indicating that proteoglycans containing chondroitin sulfate, dermatan sulfate and/or heparan sulfate side chains form part of the isolated HBP binding sites. Treatment with heparinase III which cleaves heparan sulfate side chains partially digests the HBP binding sites whereas the combined action of
- 5 heparinase III and C<sub>ABC</sub> results in a complete digestion. These data further indicate that proteoglycans are involved in HBP binding.

#### Identification of HBP-binding proteoglycans

- 10 Notably, endothelial cells express six major types of proteoglycans containing glycosaminoglycan of the heparan sulfate type, i.e. perlecan, glypican, and syndecan-1, -2, -3 and -4. Affinity-purified HBP binding sites were treated by double digestion with heparinase III and C<sub>ABC</sub> to completely remove their heparan side chains (see above). The resultant cleavage products are separated by SDS PAGE, and subjected to Western blot analysis using the mouse
- 15 monoclonal antibody mAb 3G10 that recognizes desaturated glucuronate, a neo-epitope of heparan sulfate proteoglycans exposed upon heparinase treatment (Figure 4C). For comparison, proteoglycans of total HUVEC lysates are run in parallel and identified by the relative molecular masses of their core proteins: syndecan-4 (35 K), syndecan-2 (48 K), glypican (64 K), syndecan-1 (90 K), syndecan-3 (125 K), and perlecan (> 200 K), Figure 4 (right panel,
- 20 from bottom to top). All the heparan sulfate-containing proteoglycans present in total HUVEC lysates are also present in the HBP-binding fraction (left panel) indicating that they represent docking sites for HBP.

#### Inhibition of HBP internalization

- 25 To further characterize the HBP internalization process, FACS analyses is performed on HUVECs that are preincubated with 50 µg/ml of HBP for 0.5 h followed by extensive washes to remove the free ligand (Figure 5A). Permeabilized HUVECs showed a significantly higher mean fluorescence index (MFI) than intact cells suggesting that a significant fraction of the
- 30 exogenously applied HBP had entered the cells. Incubation in the absence of HBP resulted in a MFI similar to that of intact cells indicating that the ligand had been effectively removed. Preincubation of the cells with 100 µg/ml of heparin effectively prevented uptake of HBP.



possibly due to competition with HBP for binding sites on heparan sulfate-containing proteoglycans. Incubation at 4°C significantly decreased HBP internalization for permeabilized HUVECs but not for non-permeabilized cells demonstrating that HBP internalization is an energy-dependent process. Addition of NH<sub>4</sub>Cl which has been shown to interfere with ligand release from internalized receptors thus leading to destruction rather than recirculation of internalized receptors (Gekle et al., 1995, *Am. J. Physiol.* 268:F899-906 and Rao et al., 1983, *FEBS Lett.* 160:213-216) drastically reduces HBP internalization. Cytochalasin D, an inhibitor of actin filament polymerization (Cooper, 1987, *J. Cell Biol* 105:1473-1478), lowers HBP internalization by 40.6%, whereas cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis (Ennis, 1964, *FEBS Lett.* 399:255-258), diminishes HBP internalization. Colchicine, an inhibitor of microtubulus assembly (Olmstead and Borisy, 1973, *Ann. Rev. Biochem.* 42:507-540) decreases HBP internalization by 21%. Together these findings point to the fact that HBP internalization is an active process that requires an intact and functional cytoskeleton.

#### 15 **Role of proteglycans in HBP internalization**

To further pinpoint the potential role of proteoglycans in HBP internalization, heparan sulfate proteoglycan-deficient chinese hamster ovary (CHO) cells, pgsD-677 (Murphy-Ulrich et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 272:24363-243670) and the corresponding wild-type CHO cells are used to study HBP internalization by FACS analysis. The cells are incubated with 50 µg/ml HBP for various periods of time, and HBP content is analyzed in fixed and permeabilized cells (Figure 5B). Progressive internalization of exogenously added HBP was seen over 3 hours with the wild-type CHO cells. Heparan sulfate-deficient cells also internalized HBP though at a considerably lower efficiency: internalization was decreased by 33% (30 min), 38% (1h) and 57% (3h), respectively in pgsD-677 cells compared to wild-type CHO-K1 (100% at each time point). This finding suggests that heparan sulfate-type proteoglycans are involved in HBP internalization though other sites capable of internalizing HBP must exist, e.g. chondroitin sulfate-containing proteoglycans known to be overexposed by pgsD-677 cells (Murphy-Ullrich, 1988, *op. cit.*). Therefore we treated pgsD-677 cells with CABC for 30 min prior to incubation with HBP. The CABC treatment further decreased HBP uptake by 13% (30 min) whereas it had no significant effect on wild-type CHO-K1 cells. These findings lend support to our notion that both heparan sulfate- and chondroitin sulfate-type of proteoglycans are critical to



HBP internalization though other sites may be involved in HBP internalization by CHO cells. They also demonstrate that cells other than HUVECs can specifically bind and internalize HBP.

5

#### **Subcellular fractionation of HBP-treated HUVECs**

The subcellular localization of HBP is examined by fractionation of homogenates of HUVEC cells that had been preincubated with unlabelled HBP for 24 h at 37°C. Equal amounts of protein from the various cell fractions are subjected to Western blotting using anti-HBP (Figure 7, upper panel). A major 35 kDa band and a minor 29 kDa band were present in the vesicular (lane 2) and microsomal fractions (lane 4) but not in the cytosolic (lane 1) or membrane fractions (lane 3). Note that, the majority of internalized HBP retain the molecular mass of the native protein (35 K) suggesting that it is still in the intact form. Control HUVECs kept with buffer alone failed to reveal specific immunoreactive bands. An endogenous protein, p33/gC1qR which has been demonstrated in the vesicular fraction of HUVECs (Dedio et al., 1996, FEBS Lett.399:255-258) is used to verify the fractionation procedure (Figure 7, lower panel). It appears that HBP which is absent from native HUVECs is taken up by endothelial cells and routed to their vesicular and/or microsomal compartments in its intact form.

20

#### **Colocalization of HBP and p33/gC1qR**

As shown in Figure 7, HBP binds with p33/gC1qR. Because internalized HBP colocalizes with p33/gC1qR in the vesicular fraction of HUVECs double stainings for the two proteins are performed. Endothelial cells are incubated with FITC-labeled HBP for up to 24 h, fixed and double-stained for p33 using antibodies to human p33 (from rabbit) followed by a Texas red-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (from goat). Both FITC-conjugated HBP (green) and p33/gC1qR (red) are prominent in parnuclear spots (Figure 8A). A color shift to yellow/orange in the confocal overlay and black spots in the subtraction overlay appears to indicate that at least a fraction of HBP and p33 colocalize within HUVECs (Figure 7B). Because p33/gC1qR has been demonstrated to be a mitochondrial protein, these findings seem to indicate that internalized HBP is targeted to compartments juxtaposed to or even associated with mitochondria.

30





**Effect of hHBP on Apoptosis Induced by Removal of FCS**

5 HUVECs are incubated for 24 hours with hHBP at the indicated concentrations. The medium is changed and the preincubation is followed by an 18 hours incubation in serum-free medium, to induce apoptosis. Control cells are incubated with M199 supplemented with 10% FCS. DNA fragmentation is measured by a TUNEL method. The results are shown in Figure 9. They indicate that there is a decrease in apoptosis in hHBP treated cells.

10 **Effect of hHBP on Hydrogen Peroxide Treated Cells**

HUVEC cells are treated with medium (control) and medium containing hydrogen peroxide as indicated for 18 hours in the presence or absence of hHBP for 18 hours. Apoptosis is determined as above.

15

The invention described and claimed herein is not to be limited in scope by the specific embodiments herein disclosed, since these embodiments are intended as illustrations of several aspects of the invention. Any equivalent embodiments are intended to be within the scope of this invention. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are also intended to fall within the scope of the appended claims.

20

Various references are cited herein, the disclosure of which are incorporated by reference in their entireties.



## CLAIMS

1. A method of modulating or decreasing apoptosis in mammalian cells of a mammal selected from the group consisting of beta cells of Islets of Langerhans, endothelial cells and nerve cells, comprising administering to said mammal in need thereof, a mammalian heparin-binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is produced in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells.
2. The method according to claim 1, in which the mammalian heparin-binding protein is a human or porcine HBP.
3. The method according to claim 1, in which the HBP has an amino acid sequence which has at least about an 80% identity with the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1, 2, 5, 7, 9, or 11 or an allelic or natural variant thereof.
4. The method according to claim 1, in which the HBP is encoded by a nucleic acid sequence which hybridizes to the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:3, 4, 6, 8, 10, or 12; (ii) its complementary strand, or (iii) a subsequence of (a) or (b).
5. The method according to claim 2, in which the HBP has an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1, 2, 5, 7, 9, or 11.
6. The method according to claim 1, in which the HBP is encoded by a nucleic acid sequence which hybridizes to the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:3, 4, 6, 8, 10 or 12.
7. The method according to claim 1, in which the heparin-binding protein is present in an amount of from about 10 mg to about 1 g per unit dosage form.



8. The method according to claim 1, in which the heparin-binding protein is present in an amount of about 0.1-100 mg/kg body weight.
- 5 9. The method according to claim 1, in which the heparin-binding protein is present in an amount of about 0.5-50 mg/kg body weight.
10. The method according to claim 1, in which the heparin-binding protein is present in an amount of about 1-25 mg/kg body weight.
- 10 11. A method of modulating or decreasing apoptosis in mammalian cells of a mammal selected from the group consisting of beta cells of Islets of Langerhans, endothelial cells and nerve cells, comprising administering to said mammal in need thereof a composition comprising (a) mammalian heparin binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is produced in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof and (b) a pharmaceutically acceptable carrier in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells.
- 15 12. A method of preventing or treating a disorder resulting from apoptosis of mammalian cells selected from the group consisting of beta cells of Islets of Langerhans, endothelial cells and nerve cells, in a mammal comprising administering to said mammal in need thereof a mammalian heparin-binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is produced in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells.
- 20 25 13. The method according to claim 12, in which the disorder is selected from the group consisting of a condition of insufficient functioning of insulin production or insulin action, a
- 30



neurodegenerative disorder, a neuromuscular disorder, human immunodeficiency virus and ischemic stroke.

14. The method according to claim 1, in which the mammal is a human patient.

5

15. A method of preventing or treating a disorder resulting from apoptosis of mammalian cells of a mammal selected from the group consisting of beta cells of Islets of Langerhans, endothelial cells and nerve cells, comprising administering to said mammal in need thereof a composition comprising (a) mammalian heparin-binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is produced in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof and (b) a pharmaceutically acceptable carrier in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells.

15

16. A composition comprising (a) mammalian heparin-binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is produced in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof and (b) a proteoglycan which binds to said heparin-binding protein.

20

17. A composition comprising (a) mammalian heparin-binding protein which in glycosylated form has (i) a molecular weight of about 28 kD as determined by SDS PAGE under reducing conditions; (ii) is produced in the azurophil granules of polymorphonuclear leukocytes and (iii) is a chemoattractant for monocytes or pharmaceutically active fragment thereof and (b) a protein which is a mammalian mitochondrial matrix targeting protein and which binds to said heparin-binding protein.

25

18. The composition according to claim 17 in which said mitochondrial matrix binding protein comprises a mitochondrial targeting sequence depicted in SEQ ID NO:13.

30





19. A method of modulating or decreasing apoptosis in mammalian cells of a mammal selected from the group consisting of beta cells of Islets of Langerhans, endothelial cells and nerve cells, comprising administering to said mammal in need thereof, the composition of claim 16 in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells.

5

20. A method of modulating or decreasing apoptosis in mammalian cells of a mammal selected from the group consisting of beta cells of Islets of Langerhans, endothelial cells and nerve cells, comprising administering to said mammal in need thereof the composition of claim 17 in an amount effective to modulate or decrease apoptosis in said cells.

10

15



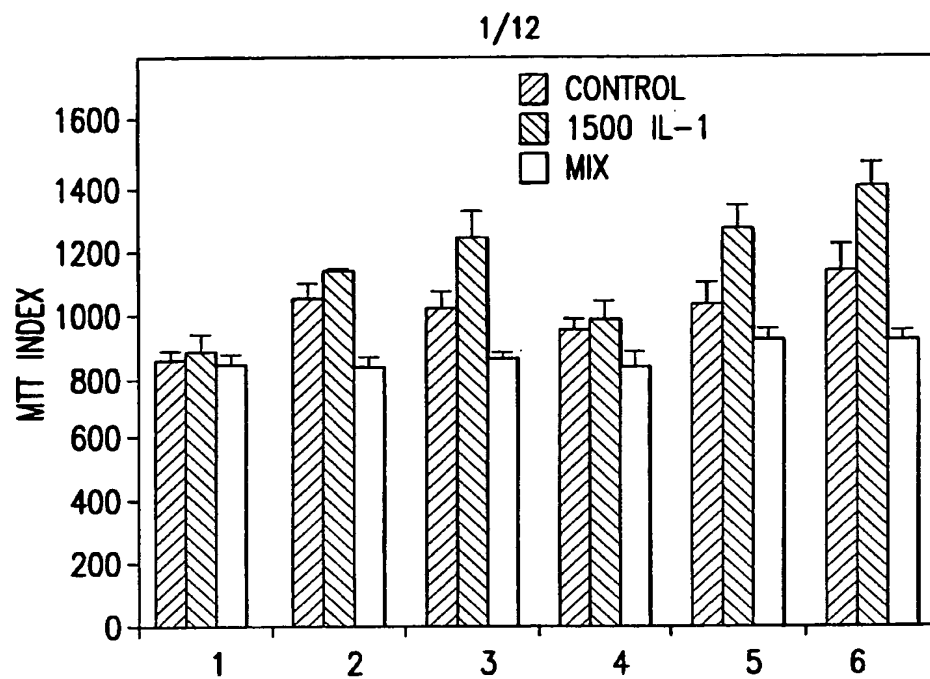


FIG.1

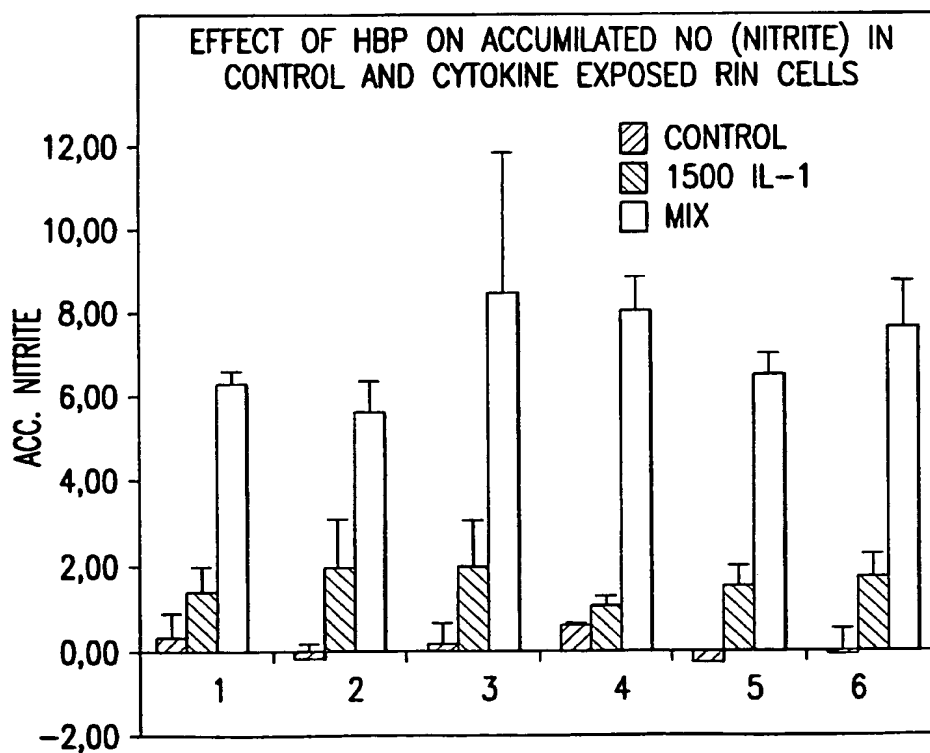


FIG.2



2/12

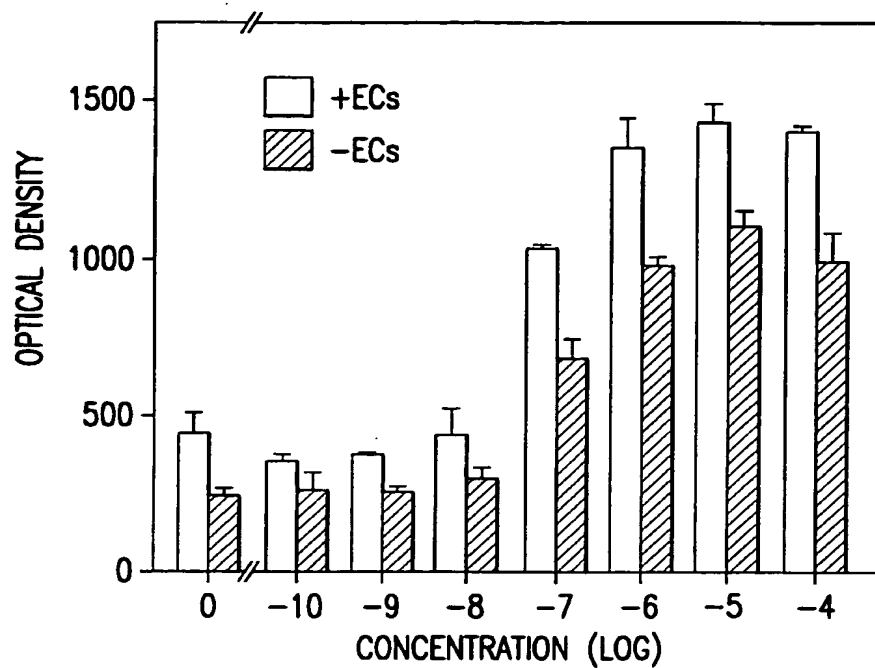


FIG.3A

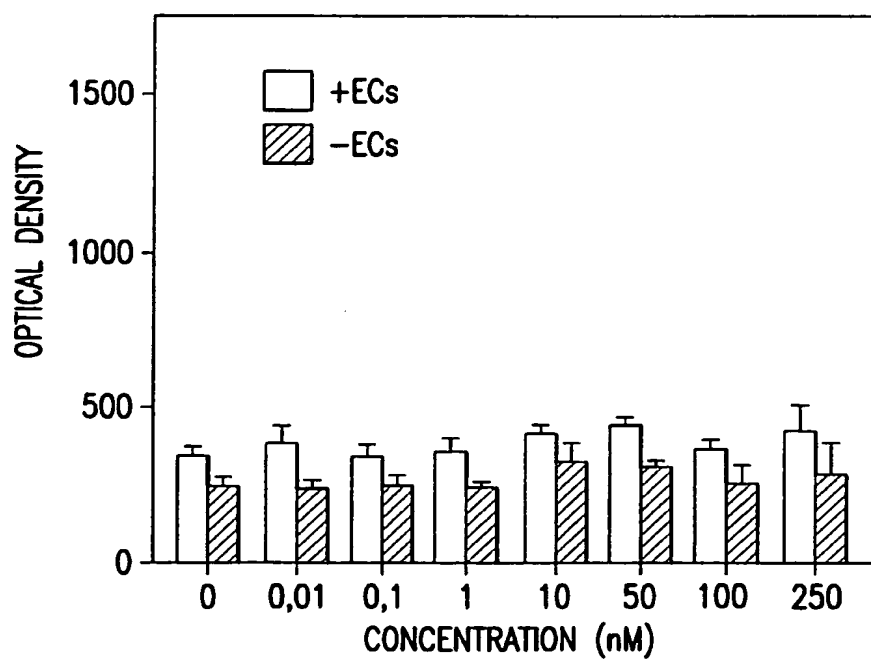


FIG.3B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



3/12

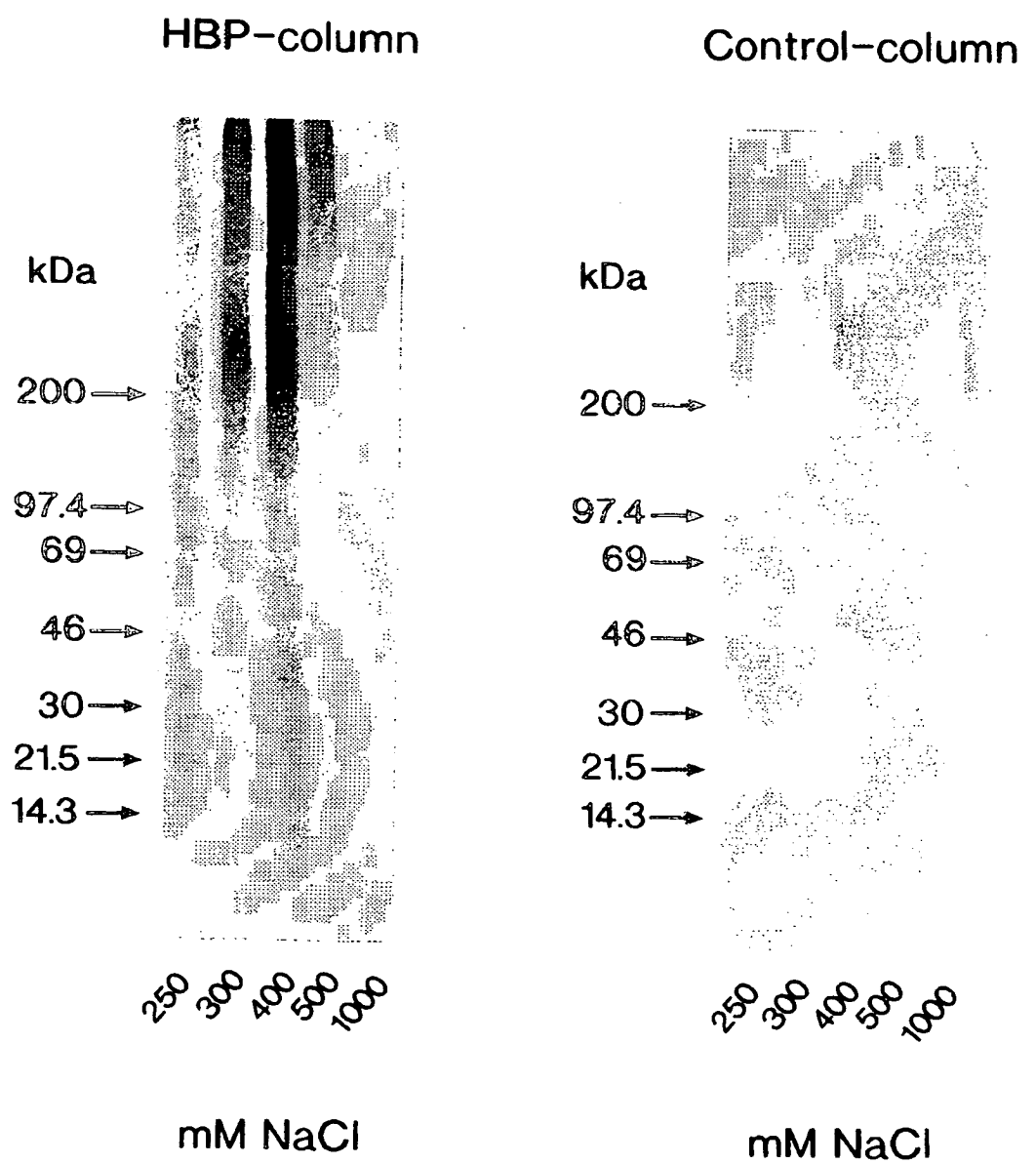
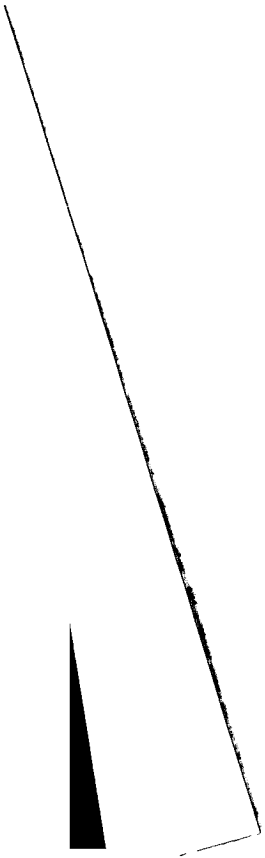


FIG.4A





4 / 12

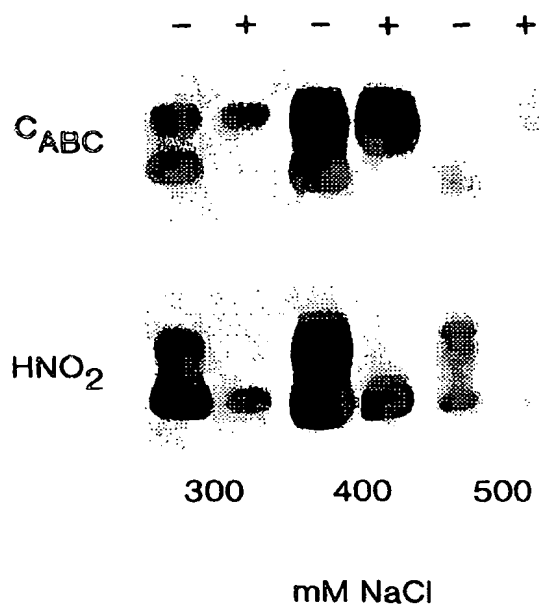
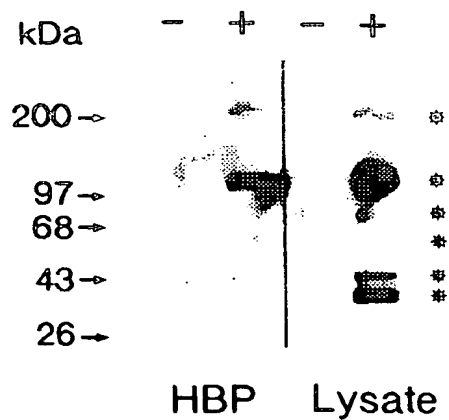


FIG.4B



5/12



HBP Lysate

FIG.4C



6/12

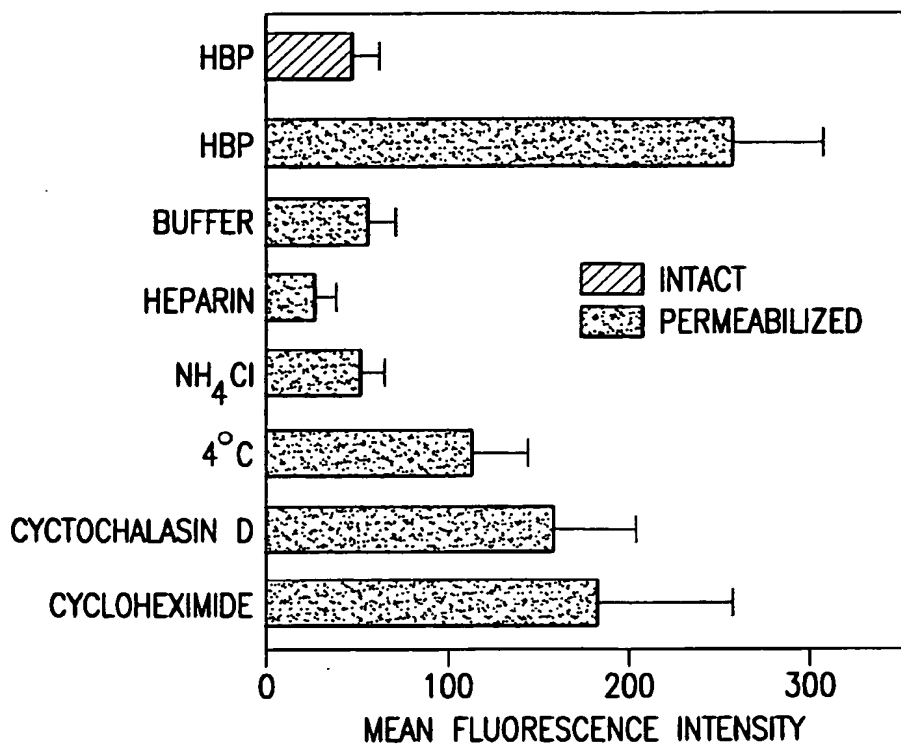


FIG. 5A

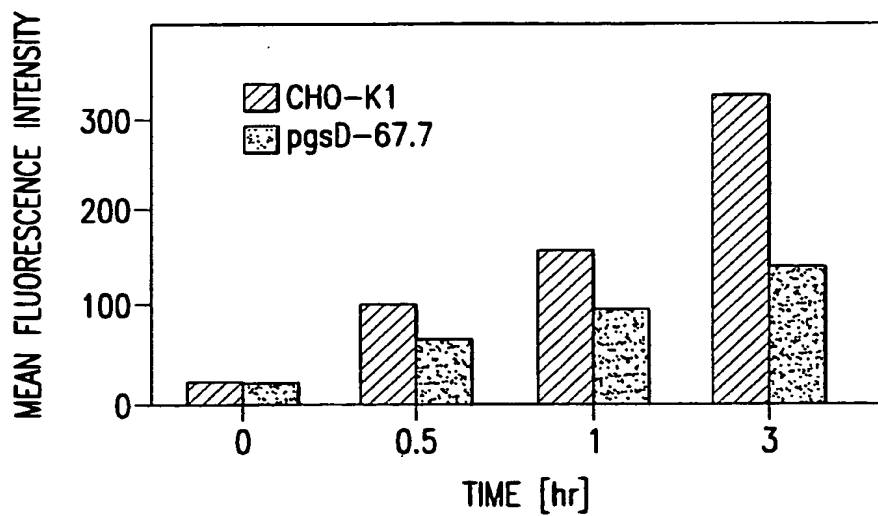


FIG. 5B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



7/12

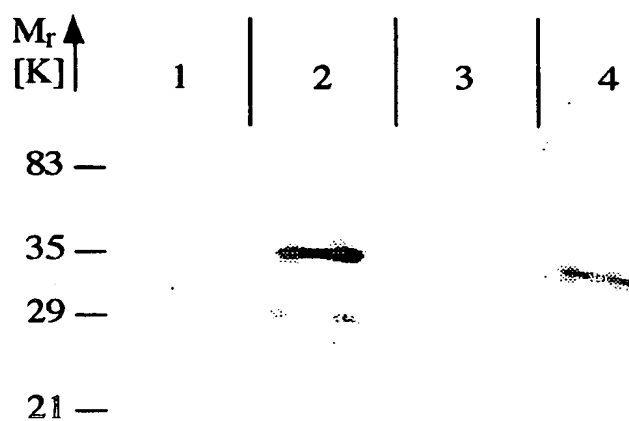


FIG. 6A

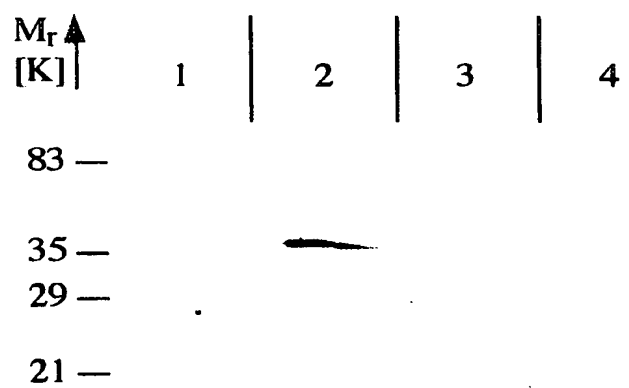


FIG. 6B





8/12

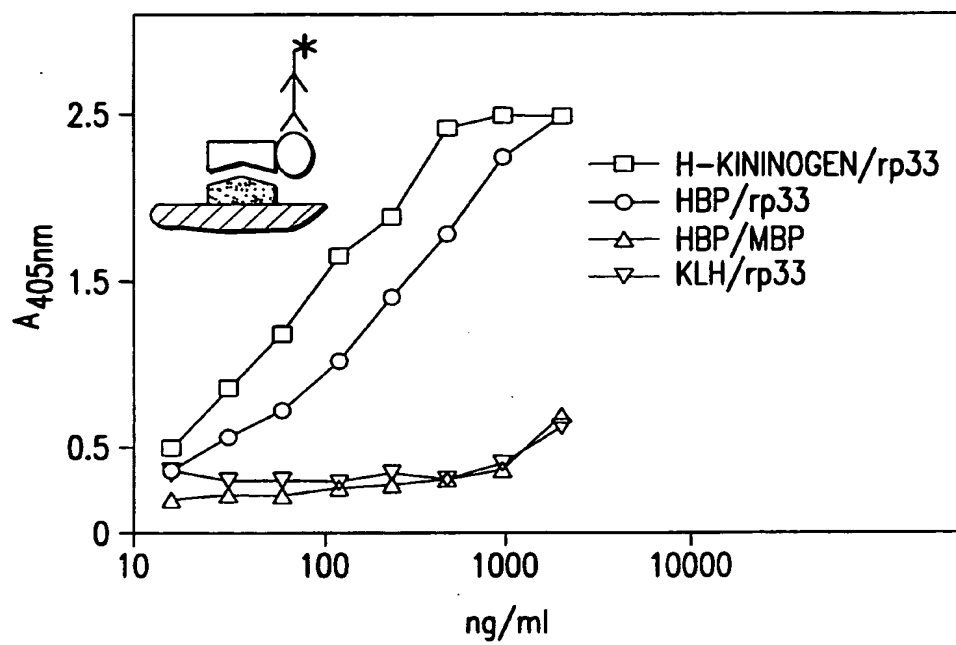


FIG. 7A



9/12

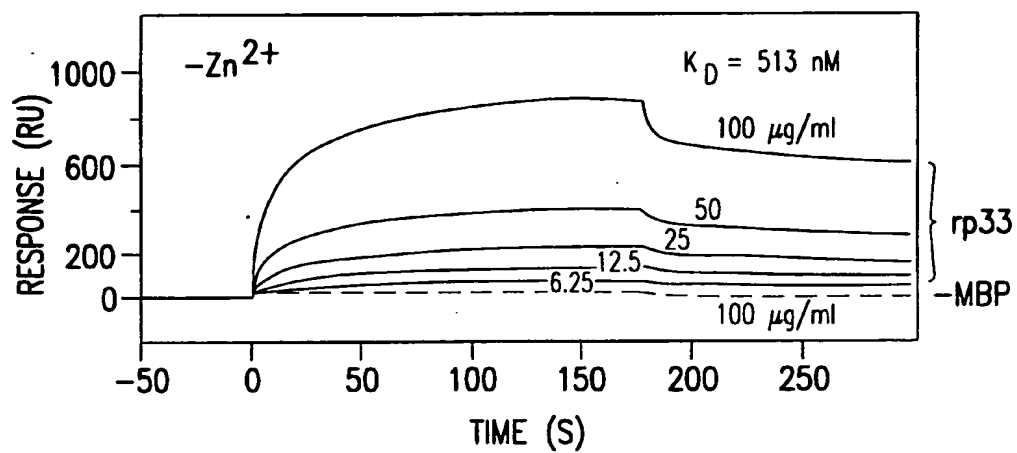


FIG. 7B

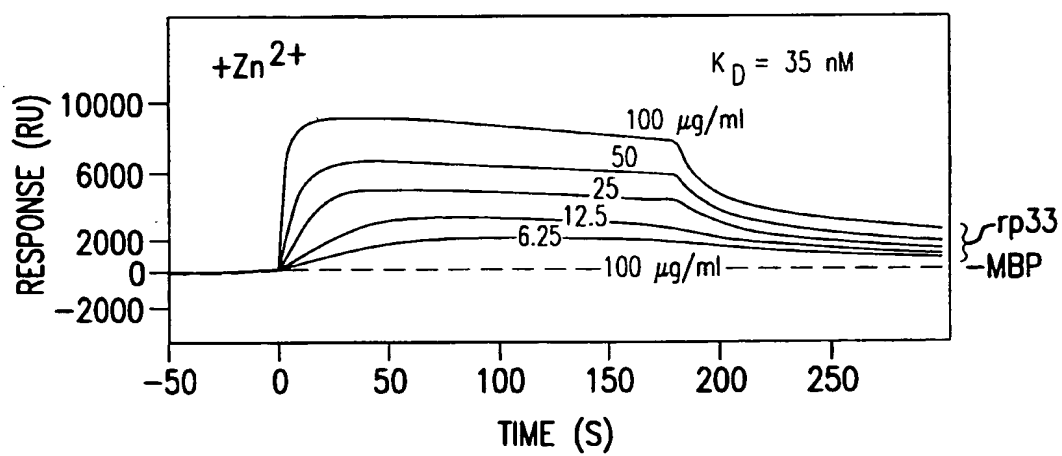


FIG. 7C



10/12

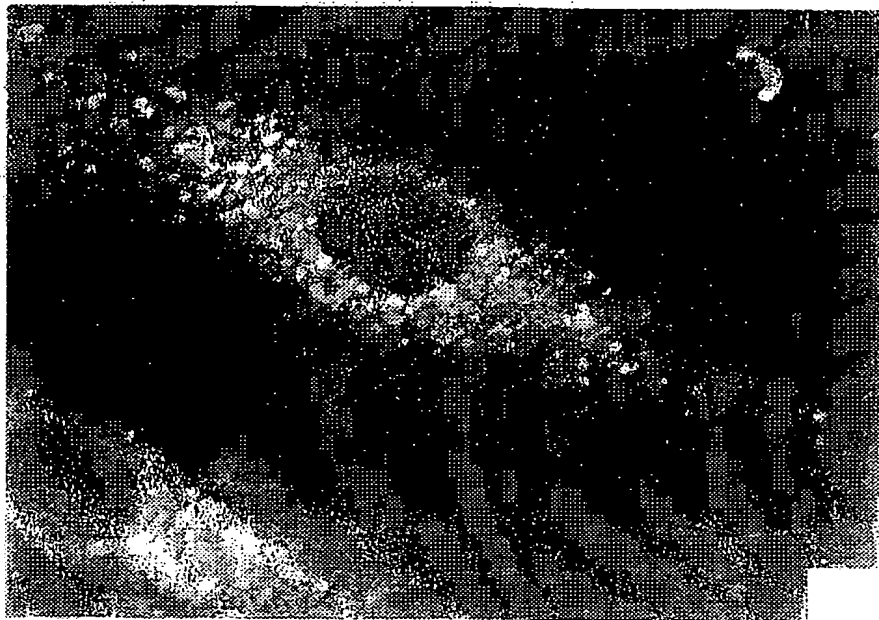


FIG. 8B

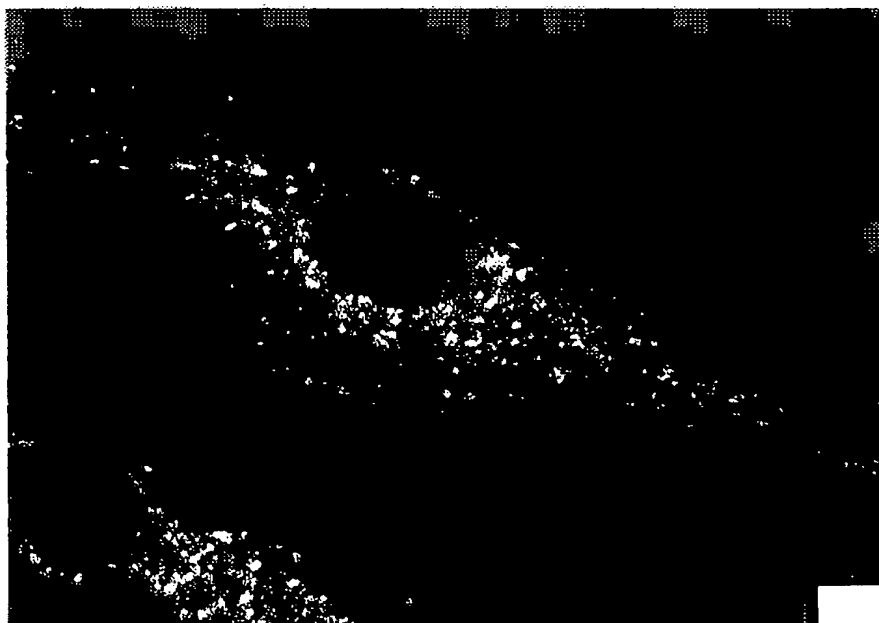


FIG. 8A



11/12

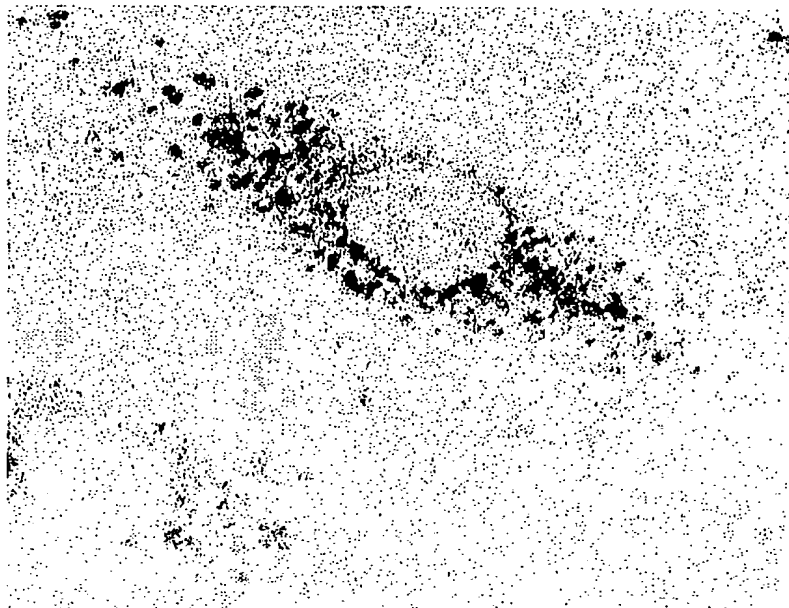


FIG.8D



FIG.8C





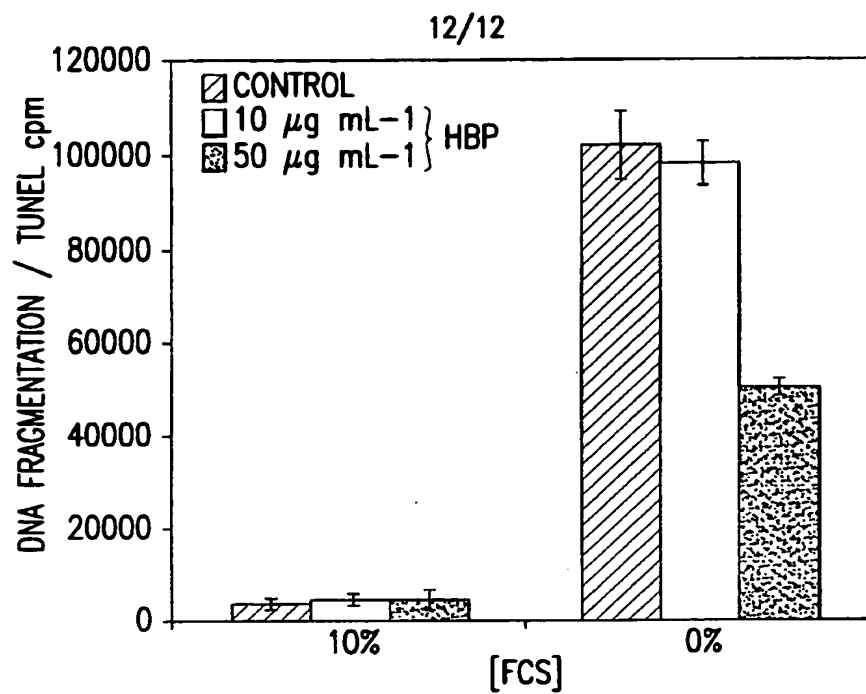


FIG.9

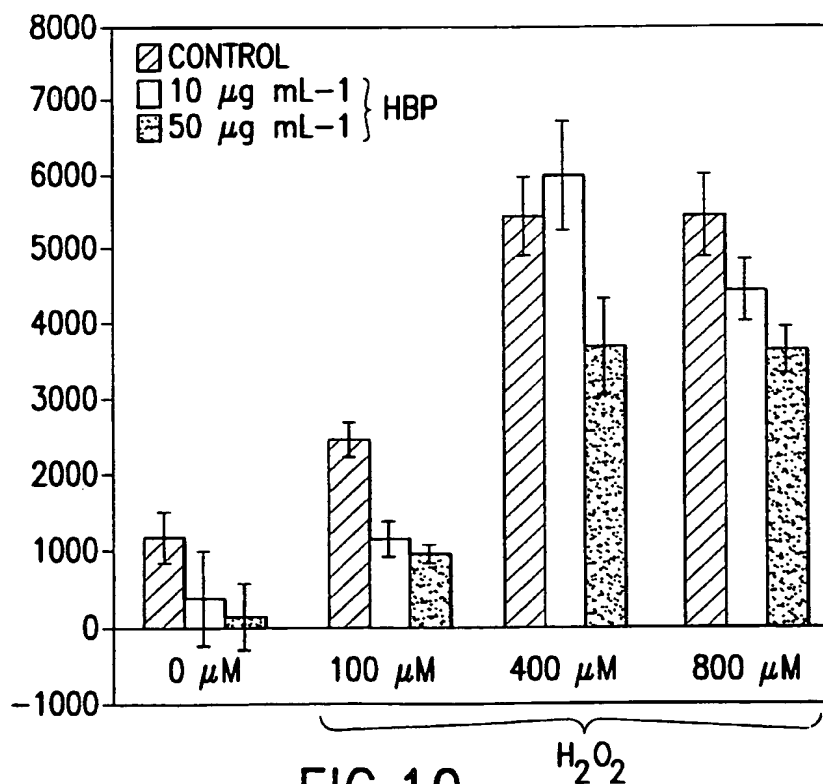


FIG.10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NOVO NORDISK A/S

<120> Use of Heparin-Binding Protein For The  
Modulation or Prophylaxis of Apoptosis of Mammalian Cells

&lt;130&gt; 5426-WO,JWki

&lt;150&gt; 1324/97

&lt;151&gt; 1997-11-20

&lt;150&gt; 1394/97

&lt;151&gt; 1997-12-03

&lt;160&gt; 16

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 3.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 634

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

Ile Leu Glu Val Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Leu
 1           5           10           15
Tyr Ser Ala Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Ala Arg Gly Gly Leu Asn
 20           25           30
Pro His Glu Pro Arg Pro His Glu Leu Glu Ala Leu Ala Ser Glu Arg
 35           40           45
Ile Leu Glu Gly Leu Asn Ala Ser Asn Gly Leu Asn Gly Leu Tyr Ala
 50           55           60
Arg Gly His Ile Ser Pro His Glu Cys Tyr Ser Gly Leu Tyr Gly Leu
 65           70           75           80
Tyr Ala Leu Ala Leu Glu Ile Leu Glu His Ile Ser Ala Leu Ala Ala
 85           90           95
Arg Gly Pro His Glu Val Ala Leu Met Glu Thr Thr His Arg Ala Leu
100           105           110
Ala Ala Leu Ala Ser Glu Arg Cys Tyr Ser Pro His Glu Gly Leu Asn
115           120           125
Ser Glu Arg Gly Leu Asn Ala Ser Asn Pro Arg Gly Leu Tyr Val Ala
130           135           140
Leu Ser Glu Arg Thr His Arg Val Ala Leu Val Ala Leu Leu Glu Gly
145           150           155           160
Leu Tyr Ala Leu Ala Thr Tyr Arg Ala Ser Pro Leu Glu Ala Arg Gly
165           170           175
Ala Arg Gly Ala Arg Gly Gly Leu Ala Arg Gly Gly Leu Asn Ser Glu
180           185           190
Arg Ala Arg Gly Gly Leu Asn Thr His Arg Pro His Glu Ser Glu Arg
195           200           205
Ile Leu Glu Ser Glu Arg Ser Glu Arg Met Glu Thr Ser Glu Arg Gly
210           215           220
Leu Ala Ser Asn Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg Ala Ser Pro Pro Arg Gly
225           230           235           240
Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser Asn Leu Glu Ala Ser Asn Ala Ser Pro

```



245 250 255  
 Leu Glu Met Glu Thr Leu Glu Leu Glu Gly Leu Asn Leu Glu Ala Ser  
 260 265 270  
 Pro Ala Arg Gly Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ser Asn Leu Glu Thr His  
 275 280 285  
 Arg Ser Glu Arg Ser Glu Arg Val Ala Leu Thr His Arg Ile Leu Glu  
 290 295 300  
 Leu Glu Pro Arg Leu Glu Pro Arg Leu Glu Gly Leu Asn Ala Ser Asn  
 305 310 315 320  
 Ala Leu Ala Thr His Arg Val Ala Leu Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu  
 325 330 335  
 Tyr Thr His Arg Ala Arg Gly Cys Tyr Ser Gly Leu Asn Val Ala Leu  
 340 345 350  
 Ala Leu Ala Gly Leu Tyr Thr Arg Pro Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly  
 355 360 365  
 Leu Asn Ala Arg Gly Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ala Arg  
 370 375 380  
 Gly Leu Glu Ser Glu Arg Ala Arg Gly Pro His Glu Pro Arg Ala Arg  
 385 390 395 400  
 Gly Pro His Glu Val Ala Leu Ala Ser Asn Val Ala Leu Thr His Arg  
 405 410 415  
 Val Ala Leu Thr His Arg Pro Arg Gly Leu Ala Ser Pro Gly Leu Asn  
 420 425 430  
 Cys Tyr Ser Ala Arg Gly Pro Arg Ala Ser Asn Ala Ser Asn Val Ala  
 435 440 445  
 Leu Cys Tyr Ser Thr His Arg Gly Leu Tyr Val Ala Leu Leu Glu Thr  
 450 455 460  
 His Arg Ala Arg Gly Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ile Leu  
 465 470 475 480  
 Glu Cys Tyr Ser Ala Ser Asn Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Gly Leu Tyr  
 485 490 495  
 Gly Leu Tyr Thr His Arg Pro Arg Leu Glu Val Ala Leu Cys Tyr Ser  
 500 505 510  
 Gly Leu Gly Leu Tyr Leu Glu Ala Leu Ala His Ile Ser Gly Leu Tyr  
 515 520 525  
 Val Ala Leu Ala Leu Ala Ser Glu Arg Pro His Glu Ser Glu Arg Leu  
 530 535 540  
 Glu Gly Leu Tyr Pro Arg Cys Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Gly  
 545 550 555 560  
 Leu Tyr Pro Arg Ala Ser Pro Pro His Glu Pro His Glu Thr His Arg  
 565 570 575  
 Ala Arg Gly Val Ala Leu Ala Leu Ala Leu Glu Pro His Glu Ala Arg  
 580 585 590  
 Gly Ala Ser Pro Thr Arg Pro Ile Leu Glu Ala Ser Pro Gly Leu Tyr  
 595 600 605  
 Val Ala Leu Leu Glu Ala Ser Asn Ala Ser Asn Pro Arg Gly Leu Tyr  
 610 615 620  
 Pro Arg Gly Leu Tyr Pro Arg Ala Leu Ala  
 625 630

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 621

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Ile Leu Glu Val Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Ala  
 1 5 10 15



Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	Pro	Arg	Gly	Leu	Asn	Gly	Leu	Pro
		20						25					30		
His	Glu	Pro	Arg	Pro	His	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Glu	Arg	Ile
		35					40					45			
Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Gly	Leu	Tyr	Ala	Arg
		50				55					60				
Gly	Pro	Arg	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Ala
65					70					75					80
Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Leu	His	Ile	Ser	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Pro
				85					90					95	
His	Glu	Val	Ala	Leu	Leu	Glu	Thr	His	Arg	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala
			100					105					110		
Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Ser	Pro	His	Glu	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu	Tyr	Leu
		115					120					125			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Glu	Arg	Gly	Leu	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ala	Leu
		130				135					140				
Ala	Ser	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Tyr	Ala
145					150					155					160
Leu	Ala	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Glu	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu	Asn
				165					170					175	
Gly	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Leu	Asn	Ser	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu
			180				185						190		
Asn	Thr	His	Arg	Pro	His	Glu	Ser	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gly
		195					200					205			
Ser	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Arg	Gly	Leu	Asn	Ala	Ser	Asn	Gly
		210				215					220				
Leu	Tyr	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Gly	Leu	Asn
225					230					235					240
Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Ser	Asn	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Glu
				245					250					255	
Leu	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Glu	Ala	Ser	Pro	Ala	Arg	Gly	Gly
			260					265					270		
Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr	His	Arg	Pro	Arg	Ser	Glu
		275					280					285			
Arg	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Leu	Pro	Arg	Leu	Glu
		290				295					300				
Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Leu	Asn	Ala	Ser	Asn	Ala	Leu	Ala	Thr	His	Arg
305					310					315					320
Val	Ala	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Tyr	Thr	His	Arg	Ala	Ser
				325					330					335	
Asn	Cys	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly
			340					345					350		
Leu	Tyr	Thr	Arg	Pro	Gly	Leu	Tyr	Thr	His	Arg	Gly	Leu	Asn	Ala	Arg
		355					360					365			
Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Glu	Pro	His	Glu	Ser	Glu
		370				375					380				
Arg	Ala	Arg	Gly	Pro	His	Glu	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Val	Ala	Leu	Leu
385					390					395					400
Glu	Ala	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	Thr	His	Arg	Val	Ala	Leu	Thr	His	Arg
				405					410					415	
Ser	Glu	Arg	Ala	Ser	Asn	Pro	Arg	Cys	Tyr	Ser	Leu	Glu	Pro	Arg	Ala
			420					425					430		
Arg	Gly	Ala	Ser	Pro	Met	Glu	Thr	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu
		435					440					445			
Tyr	Val	Ala	Leu	Pro	His	Glu	Ser	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly
		450				455					460				
Gly	Leu	Tyr	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Glu	Ser	Glu	Arg	Gly	Leu	Asn	Gly
465					470					475					480





Leu Tyr Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Thr His Arg Pro Arg  
 485 490 495  
 Leu Glu Val Ala Leu Cys Tyr Ser Ala Ser Asn Gly Leu Tyr Leu Glu  
 500 505 510  
 Ala Leu Ala Gly Leu Asn Gly Leu Tyr Val Ala Leu Ala Leu Ala Ser  
 515 520 525  
 Glu Arg Pro His Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Arg Gly  
 530 535 540  
 Pro His Glu Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ser Glu Arg Ser Glu Arg Gly  
 545 550 555 560  
 Leu Tyr Pro His Glu Pro His Glu Thr His Arg Ala Arg Gly Val Ala  
 565 570 575  
 Leu Ala Leu Ala Leu Glu Pro His Glu Ala Arg Gly Ala Ser Asn Thr  
 580 585 590  
 Arg Pro Ile Leu Glu Ala Ser Pro Ser Glu Arg Val Ala Leu Leu Glu  
 595 600 605  
 Ala Ser Asn Ala Ser Asn Pro Arg Pro Arg Ala Leu Ala  
 610 615 620

<210> 3  
 <211> 678  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 atcggttgccg gccggaaggc gaggcccccgc cagttcccgt tcctggcctc cattcagaat 60  
 caaggcaggc acttctgcgg ggggtgccctg atccatgccc gcttcgtgat gaccgcggcc 120  
 agctgcttcc aaagccagaa ccccgggggtt agcaccgtgg tgctgggtgc ctatgacctg 180  
 agggcgccgg agaggcagtc ccgccagacg ttttccatca gcagcatgag cgagaatggc 240  
 tacgaccccc agcagaacct gaacgacctg atgctgcttc agctggaccg tgaggccaac 300  
 ctcaccagca gcgtgacgat actgccactg cctctgcaga acgccacggt ggaagccggc 360  
 accagatgcc aggtggccgg ctggggggagc cagcgcagtg gggggcgctc ctcccgtttt 420  
 cccaggttcg tcaacgtgac tgtgaccccc gaggaccagt gtcgccccaa caacgtgtgc 480  
 accggtgtgc tcaccgcccg cgggtggcatc tgcaatgggg acggggggcac cccctcgtc 540  
 tgcgagggcc tggccacagg cgtggcctcc ttttccctgg ggccctgtgg ccgaggccct 600  
 gacttcttca cccgagtggc gctcttccga gactggatcg atggcgtttt aaacaatccg 660  
 ggaccggggc cagcctag 678

<210> 4  
 <211> 663  
 <212> DNA  
 <213> Sus scrofa

<400> 4  
 attgtgggcg gcaggagggc ccagccgcag gagttcccgt ttctggcctc cattcagaaa 60  
 caaggagggc ctttttgcgc cggagccctg gtccatcccc gcttcgtcct gacagcggcc 120  
 agctgcttcc gtggcaagaa cagcgggaagt gcctctgtgg tgctgggggc ctatgacctg 180  
 aggcagcagg agcagtcccg gcagacattc tccatcagga gcatcagcca gaacggctat 240  
 gayccccggc agaattctgaa cgatgtgctg ctgctgcagc tggaccgtga ggccagactc 300  
 acccccagtg tggccctggg accgctgccc ccgcagaatg ccacagtgga agctggcacc 360  
 aactgccaaag ttgctgggctg ggggacccag cggcttagga ggctttttct ccgcttccca 420  
 aggggtgctca atgtcaccgt gacctcaaac ccgtgtctcc ccagagacat gtgcattggg 480  
 gtcttcagcc gccggggccg catcagccag ggagacagag gcacccccct cgtctgaac 540  
 ggcttgccgc agggcggtgg ctccttcctc cggaggcggt tccgcaggag ctccggcttc 600  
 ttcaccgcg tggcgctctt cagaaattgg attgattcag ttctcaacaa cccgccggcc 660  
 tga 663

<210> 5



<211> 699  
 <212> DNA  
 <213> homo sapiens

<400> 5

```

ggctccagcc cccttttggga catcgttggc ggccggaagg cgaggccccg ccagttcccc 60
ttcctggcct ccattcagaa tcaaggcagg cacttctgcg ggggtgccct gatccatgcc 120
cgcttcgtga tgaccgcggc cagctgcttc caaagccaga accccggggt tagcaccgtg 180
gtgctgggtg cctatgacct gaggcggcgg gagaggcagt cccgccagac gttttccatc 240
agcagcatga gcgagaatgg ctacgacccc cagcagaacc tgaacgacct gatgctgctt 300
cagctgggacc gtgaggccaa cctcaccagc agcgtgacga tactgccact gcctctgcag 360
aacgccacgg tggaagcccg caccagatgc caggtggccg gctgggggag ccagcgcagt 420
ggggggcgtc tctcccgttt tcccaggttc gtcaacgtga ctgtgacccc cgaggaccag 480
tgctgccccca acaacgtgtg caccggtgtg ctcacccgcc gcggtggcat ctgcaatggg 540
gacgggggca cccccctcgt ctgcgagggc ctggcccacg gcgtggcctc cttttccctg 600
gggccctgtg gccgaggccc tgacttcttc acccgagtgg cgtcttcccg agactggatc 660
gatggcgttt taaacaatcc gggaccgggg ccagcctag 699
  
```

<210> 6  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

Gly Ser Ser Pro Leu Leu Asp Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro
 1          5          10          15
Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe
 20          25          30
Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser
 35          40          45
Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala
 50          55          60
Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile
 65          70          75          80
Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp
 85          90          95
Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val
100          105          110
Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr
115          120          125
Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu
130          135          140
Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln
145          150          155          160
Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly
165          170          175
Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala
180          185          190
His Gly Val Ala Ser Phe Ser Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp
195          200          205
Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu
210          215          220
Asn Asn Pro Gly Pro Gly Pro Ala
225          230
  
```

<210> 7  
 <211> 756  
 <212> DNA



&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 7

```

atgacccggc tgacagtcc tggcctgctg gctgggtctgc tggcgtcctc gagggccggc      60
tccagccccc ttttgacat cgttgccggc cggaaggcga ggccccgcca gttcccgttc      120
ctggcctcca ttcagaatca aggcaggcac ttctgcgggg gtgccctgat ccatgcccg      180
ttcgtgatga ccgcggccag ctgcttccaa agccagaacc ccgggggttag caccgtggtg      240
ctgggtgcct atgacctgag gcggcgggag aggcagtccc gccagacgtt ttccatcagc      300
agcatgagcg agaattggcta cgacccccag cagaacctga acgacctgat gctgcttcag      360
ctggaccgtg aggccaacct caccagcagc gtgacgatac tgccactgcc tctgcagaac      420
gccacggtgg aagccggcac cagatgccag gtggccggct gggggagcca gcgcagtggg      480
gggcgtctct cccgttttcc caggttcgtc aacgtgactg tgacccccga ggaccagtgt      540
cgccccaaac acgtgtgcac cgggtgtgctc acccgccgcg gtggcatctg caatggggac      600
gggggcaccc ccctcgtctg cgaggccctg gccacggcg tggcctcctt ttccctgggg      660
ccctgtggcc gaggcctga cttcttcacc cgagtggcgc tcttcgaga ctggatcgat      720
ggcgttttaa acaatccggg accggggcca gcctag                                     756

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 225

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

```

Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala
 1           5           10           15
Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His
 20           25           30
Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro
 35           40           45
Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu
 50           55           60
Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly
 65           70           75           80
Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp
 85           90           95
Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu
100           105           110
Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp
115           120           125
Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val
130           135           140
Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys
145           150           155           160
Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly
165           170           175
Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser
180           185           190
Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu
195           200           205
Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu Asn Asn Pro Gly Pro Gly Pro
210           215           220
Ala
225

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; sus scrofa



&lt;400&gt; 9

```

atgccagcac tcagattcct ggccctgctg gccagcctgc tggcaacctc caggggttatt      60
gtgggaggca ggagggccca gccgcaggag ttcccgtttc tggcctccat tcagaaacaa      120
gggaggccct tttgcgccgg agccctggtc catccccgct tcgtctgac agcggccagc      180
tgcttccgtg gcaagaacag cggaagtgcc tctgtggtgc tgggggccta tgacctgagg      240
cagcaggagc agtcccggca gacattctcc atcaggagca tcagccagaa cggctatgay      300
cccgggcaga atctgaacga tgtgctgctg ctgcagctgg accgtgaggc cagactcacc      360
cccggtgtgg ccctggtacc gctgcccccg cagaatgcc cagtggagc tggcaccaac      420
tgccaagtgt cgggctgggg gacccagcgg cttaggaggc ttttctccc cttcccaagg      480
gtgctcaatg tcaccgtgac ctcaaaccog tgtctcccca gagacatgtg cattggtgtc      540
ttcagccgcc ggggcccgat cagccaggga gacagaggca cccccctcgt ctgcaacggc      600
ctggcgccag gcgtggcctc cttcctccgg aggcgtttcc gcaggagctc cggcttcttc      660
accgcgctgg cgctcttcag aaattggatt gattcagttc tcaacaaccc gccggcctga      720

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa

&lt;400&gt; 10

```

Met Pro Ala Leu Arg Phe Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu Ala Thr
 1          5          10          15
Ser Arg Val Ile Val Gly Gly Arg Arg Ala Gln Pro Gln Glu Phe Pro
 20          25          30
Phe Leu Ala Ser Ile Gln Lys Gln Gly Arg Pro Phe Cys Ala Gly Ala
 35          40          45
Leu Val His Pro Arg Phe Val Leu Thr Ala Ala Ser Cys Phe Arg Gly
 50          55          60
Lys Asn Ser Gly Ser Ala Ser Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg
 65          70          75          80
Gln Gln Glu Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Arg Ser Ile Ser Gln
 85          90          95
Asn Gly Tyr Asp Pro Arg Gln Asn Leu Asn Asp Val Leu Leu Leu Gln
100          105          110
Leu Asp Arg Glu Ala Arg Leu Thr Pro Ser Val Ala Leu Val Pro Leu
115          120          125
Pro Pro Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Asn Cys Gln Val Ala
130          135          140
Gly Trp Gly Thr Gln Arg Leu Arg Arg Leu Phe Ser Arg Phe Pro Arg
145          150          155          160
Val Leu Asn Val Thr Val Thr Ser Asn Pro Cys Leu Pro Arg Asp Met
165          170          175
Cys Ile Gly Val Phe Ser Arg Arg Gly Arg Ile Ser Gln Gly Asp Arg
180          185          190
Gly Thr Pro Leu Val Cys Asn Gly Leu Ala Gln Gly Val Ala Ser Phe
195          200          205
Leu Arg Arg Arg Phe Arg Arg Ser Ser Gly Phe Phe Thr Arg Val Ala
210          215          220
Leu Phe Arg Asn Trp Ile Asp Ser Val Leu Asn Asn Pro Pro Ala
225          230          235

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 741

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; sus scrofa

&lt;400&gt; 11





```

atgccagcac tcagattcct ggccctgctg gccagcctgc tggcaacctc cagggttggc 60
ttggccaacc ttgcagacat tgtgggcggc aggagggccc agccgcagga gttcccgttt 120
ctggcctoca ttcagaaaca agggaggccc ttttgcgccg gagccctggt ccatccccgc 180
ttcgtcctga cagcggccag ctgcttcctg ggcaagaaca gcggaagtgc ctctgtggtg 240
ctgggggcct atgacctgag gcagcaggag cagtcgccgc agacattctc catcaggagc 300
atcagccaga acggctatga cccccggcag aatctgaacg atgtgctgct gctgcagctg 360
gaccgtgagg ccagactcac ccccaagtgt gccctggtac cgctgccccg gcagaatgcc 420
acagtggaa gctggcacc aa ctgccaagtt gcgggctggg ggaccagcg gcttaggagg 480
cttttctccc gcttcccaag ggtgctcaat gtcaccgtga cctcaaaccg gtgtctcccc 540
agagacatgt gcattggtgt cttcagccgc cggggccgca tcagccaggg agacagaggc 600
acccccctcg tctgcaacgg cctggcgagc ggcgtggcct ccttcctccg gaggcgtttc 660
cgcaggagct ccggcttctt caccgcgtg gcgctcttca gaaattggat tgattcagtt 720
ctcaacaacc cgccggcctg a 741

```

```

<210> 12
<211> 246
<212> PRT
<213> Sus scrofa

```

```

<400> 12
Met Pro Ala Leu Arg Phe Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu Ala Thr
1 5 10 15
Ser Arg Val Gly Leu Ala Thr Leu Ala Asp Ile Val Gly Gly Arg Arg
20 25 30
Ala Gln Pro Gln Glu Phe Pro Phe Leu Ala Ser Ile Gln Lys Gln Gly
35 40 45
Arg Pro Phe Cys Ala Gly Ala Leu Val His Pro Arg Phe Val Leu Thr
50 55 60
Ala Ala Ser Cys Phe Arg Gly Lys Asn Ser Gly Ser Ala Ser Val Val
65 70 75 80
Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Gln Gln Glu Gln Ser Arg Gln Thr Phe
85 90 95
Ser Ile Arg Ser Ile Ser Gln Asn Gly Tyr Asp Pro Arg Gln Asn Leu
100 105 110
Asn Asp Val Leu Leu Leu Gln Leu Asp Arg Glu Ala Arg Leu Thr Pro
115 120 125
Ser Val Ala Leu Val Pro Leu Pro Pro Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala
130 135 140
Gly Thr Asn Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Thr Gln Arg Leu Arg Arg
145 150 155 160
Leu Phe Ser Arg Phe Pro Arg Val Leu Asn Val Thr Val Thr Ser Asn
165 170 175
Pro Cys Leu Pro Arg Asp Met Cys Ile Gly Val Phe Ser Arg Arg Gly
180 185 190
Arg Ile Ser Gln Gly Asp Arg Gly Thr Pro Leu Val Cys Asn Gly Leu
195 200 205
Ala Gln Gly Val Ala Ser Phe Leu Arg Arg Arg Phe Arg Arg Ser Ser
210 215 220
Gly Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Phe Arg Asn Trp Ile Asp Ser Val
225 230 235 240
Leu Asn Asn Pro Pro Ala
245

```

```

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pcr primers

&lt;400&gt; 13

ccgggggatcc aactaggctg gccccggtcc cgg

33

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pcr primers

&lt;400&gt; 14

ccgggggatcc gatgaccggtg ctgacagtcc tgg

33

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

Met	Leu	Pro	Leu	Leu	Arg	Cys	Val	Pro	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Val
1				5					10					15	
Ala	Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Phe	Arg	Gln	Leu	Leu
			20					25					30		

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 281

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Met	Leu	Pro	Leu	Leu	Arg	Cys	Val	Pro	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Val
1				5					10					15	
Ala	Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Phe	Arg	Gln	Leu	Leu
			20					25					30		
Gln	Pro	Ala	Pro	Arg	Leu	Cys	Thr	Arg	Pro	Phe	Gly	Leu	Leu	Ser	Val
		35				40						45			
Arg	Ala	Gly	Ser	Glu	Arg	Arg	Pro	Gly	Leu	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Pro
	50					55					60				
Cys	Ala	Cys	Gly	Cys	Gly	Cys	Gly	Ser	Leu	His	Thr	Asp	Gly	Asp	Lys
65				70					75					80	
Ala	Phe	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Asp	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Arg	Lys	Ile
			85						90					95	
Gln	Lys	His	Lys	Thr	Leu	Pro	Lys	Met	Ser	Gly	Gly	Trp	Glu	Leu	Glu
			100					105					110		
Leu	Asn	Gly	Thr	Glu	Ala	Lys	Leu	Val	Arg	Lys	Val	Ala	Gly	Glu	Lys
	115						120					125			
Ile	Thr	Val	Thr	Phe	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Asp
	130					135					140				
Gly	Glu	Glu	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly	Gln	Lys	Val	Glu	Glu	Gln	Glu	Pro
145					150					155					160
Glu	Leu	Thr	Ser	Thr	Pro	Asn	Phe	Val	Val	Glu	Val	Ile	Lys	Asn	Asp
				165					170					175	
Asp	Gly	Lys	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Asp	Cys	His	Tyr	Pro	Glu	Asp	Glu







## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 98/00510

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC6: A61K 38/18, C07K 14/47 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9628544 A1 (NOVO NORDISK A/S), 19 Sept 1996 (19.09.96), page 2, line 20 - line 23; page 7, line 6 - line 10; page 8, line 5 - line 16  --	1-20
X	Dialog Information Services, File 73, EMBASE, Dialog accession no. 05701574, EMBASE accession no. 1994116083, Small D.H. et al: "A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth", Journal of Neuroscience (J. NEUROSCI.) (United States) 1994, 14/4 (2117-2127)  --	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 February 1999		08 -03- 1999
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer  Carolina Palmcrantz Telephone No. +46 8 782 25 00





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. -

PCT/DK 98/00510

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Dialog Information Services, File 155,  Dialog accession no. 09343439, MEDLINE,  Medline accession no. 98042252, Barasch J et al:  "Ureteric bud cells secrete multiple factors,  including bFGF, which resuce renal progenitors  from apoptosis", Am J Physiol (UNITED STATES)  Nov 1997, 273 (5 Pt 2) pF757-67</p> <p>--</p>	1-20
P,X	<p>Dialog Information Services, File 155, MEDLINE,  Dialog accession no. 09354776, Medline accession  no. 98049575, Takemura T. et al: "The membrane-bound  form heparin-binding epidermal growth factor-like  growth factor promotes survival of cultures renal  epithelialcells", J Biol Chem (UNITED STATES)  Dec 5 1997, 272 (49) p 31036-42</p> <p>--</p>	1-20
P,X	<p>Dialog Information Services, File 155, MEDLINE,  Dialog accession no.09354396, Medline accession  no. 98060597, Zushi S et al: "Role of heparin-  binding EGF-related peptides in proliferation  and apoptosis of activated ras-stimulated  intestinal epithelial cells", Int J Cancer  (UNITED STATES) Dec 10 1997, 73 (6) p 917-23</p> <p>--  -----</p>	1-20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK98/00510

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-15, 19-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 1-15 and 19-20 relate to methods of treatment of the human or animal body by therapy Rule.39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## 02/02/99

PCT/DK 98/00510

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)





## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08205893 A**(43) Date of publication of application: **13 . 08 . 96**

(51) Int. Cl.

**C12Q 1/37**  
**C12N 9/64**  
**C12Q 1/02**  
**C12Q 1/70**  
**G01N 33/573**

(21) Application number: **07304186**(22) Date of filing: **22 . 11 . 95**(30) Priority: **08 . 12 . 94 JP 06304877**(71) Applicant: **SUMITOMO METAL IND LTD**

(72) Inventor: **TAKESHITA TOKUMATSU**  
**KAKIUCHI NOBUKO**  
**KOMODA YASUMASA**

**(54) METHOD FOR MEASURING ACTIVITY OF HCV PROTEASE**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To measure the subject enzymic activity required for developing an antihepatitis C virus (HCV) agent by expressing a gene in a specific region of an HCV precursor polyprotein in *Escherichia coli* and reacting the resultant HCV protease with a synthetic substrate.

**CONSTITUTION:** An HCV protease obtained by integrating a gene capable of coding an NS3 region and NS4A region and, as necessary, a region on the downstream side thereof in a nonstructural protein of an

HCV precursor protein into a vector, then transducing the resultant vector into *Escherichia coli* and expressing the gene therein is reacted with a synthetic substrate peptide labeled with biotin or an antigenic substance or an antibody substance [label (a)] and a labeled peptide which is a cleavage product thereof is further labeled with an antigenic substance [label (b)] to join the antigenic substance labeled in the peptide to an enzymically labeled antibody against the antigen. The enzymic activity thereof is then measured to measure the HCV protease activity useful for the screening, etc., of an HCV protease inhibitor with good operating efficiency and quantitative determinability.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO





(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-205893

(43) 公開日 平成8年(1996)8月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/37		6807-4B		
C 1 2 N 9/64	Z			
C 1 2 Q 1/02		6807-4B		
1/70		9453-4B		
G 0 1 N 33/573	A			

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平7-304186

(22) 出願日 平成7年(1995)11月22日

(31) 優先権主張番号 特願平6-304877

(32) 優先日 平6(1994)12月8日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002118

住友金属工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 竹下 徳末

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

住友金属工業株式会社内

(72) 発明者 垣内 信子

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

住友金属工業株式会社内

(72) 発明者 菰田 泰正

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

住友金属工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54) 【発明の名称】 H C V プロテアーゼ活性測定法

(57) 【要約】

【目的】 操作性および定量性に優れたH C V プロテアーゼ活性の測定法、ならびにH C V プロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法を提供する。

【構成】 C型肝炎ウイルス (H C V) 前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS 3領域およびNS 4 A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるH C V プロテアーゼと、合成基質ペプチドとを試験管内で反応させることからなる、H C V プロテアーゼ活性の測定法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルス（HCV）前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させることからなる、HCVプロテアーゼ活性の測定法。

【請求項2】 HCVプロテアーゼが、NS3領域およびNS4A領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項3】 HCVプロテアーゼが、NS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項4】 HCVプロテアーゼが、NS3領域、NS4A領域、NS4B領域およびNS5A領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項5】 HCVプロテアーゼが、NS3領域、NS4A領域、NS4B領域、NS5A領域およびNS5B領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項6】 合成基質ペプチドがNS3/NS4A、NS4A/NS4B、NS4B/NS5AまたはNS5A/NS5Bの各切断部位近傍のペプチド、あるいはこれらのペプチド中のコンセンサスアミノ酸以外の1または2以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したペプチドである、請求項1記載の測定法。

【請求項7】 合成基質ペプチドが10～20アミノ酸である、請求項6記載の測定法。

【請求項8】 合成基質ペプチドがNS5A/NS5B切断部位近傍のペプチドである、請求項6記載の測定法。

【請求項9】 C型肝炎ウイルス（HCV）前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させる系において、反応系に試験化合物を添加し、該合成基質ペプチドの切断反応の進行を、試験化合物添加のものと添加しないものとで比較することからなる、HCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法。

【請求項10】 以下の工程からなる、請求項1記載のHCVプロテアーゼ活性の測定法：

(1) C型肝炎ウイルス（HCV）前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、ビオチンまたは抗原物質または抗体

物質で標識（標識a）した合成基質ペプチドとを反応させる；

(2) 工程（1）の切断産物である標識ペプチドを、さらに抗原物質で標識（標識b）する；

(3) ペプチドに標識した前記抗原物質に、前記抗原に対する酵素標識抗体を結合する；そして

(4) 工程（3）の酵素の活性を測定する、ただし、工程（2）、工程（3）または工程（4）の前に、標識aに対する親和性を利用して標識ペプチドの固定化を行う。

【請求項11】 合成基質ペプチドがシステインを含む場合、抗原物質による標識（標識b）に先立って、システインのチオール基が抗原で標識されないようにチオール基を修飾しておくことを特徴とする請求項10記載の測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、抗HCV剤開発に不可欠なアッセイ系に関する。より詳しくは、本発明はHCVプロテアーゼ活性の測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】本邦に於ける慢性非A非B型肝炎患者は120万人いると推定されているが、その6割がC型肝炎ウイルス（HCV）に因るものであるとされている。又、慢性C型肝炎は高い確率で肝硬変、肝細胞癌へ移行するとされる。しかも、HCVキャリアーは本邦では人口の1～2%を占め、若年層になるにつれて比率は低下するものの、これらキャリアーは将来肝炎発症のリスクを負っていることになる。したがって、非A非B型肝炎発症時の早い時期にウイルスを排除することが必要である。インターフェロンによる治療は最も一般に行なわれる治療であるが、その治癒率は20～40%に過ぎず、また深刻な副作用や高価な経費の問題を有している。そこでより効果的な抗HCV剤の開発が望まれている。

【0003】HCVは1988年に米国Chiron社がウイルスの遺伝子の一部の塩基配列を明かにして以来（(Q.-L. Choo et al., Science, 244, 359, (1989)、G. Quo, et al. Science, 244, 362 (1989)）、分子生物学的手法による遺伝子解明がなされた。その結果HCVはフラビウイルス、ペスチウイルスに近似のRNAウイルスであることが明かとなった。これらウイルスは、遺伝子である一本鎖RNAをmRNAとして、宿主細胞中で一続きの長い蛋白が翻訳される。ウイルス蛋白はウイルス粒子を構成する構造蛋白とウイルス生活環のなかで必要な機能を担っている非構造蛋白（NS）とに分けられるが、構造蛋白は宿主のエンドペプチダーゼで切断を受け、非構造蛋白はウイルス遺伝子から翻訳されるプロテアーゼで切断され、機能型の蛋白となる。ウイルス由来プロテアーゼは他のウイルス例えばHIV（ヒト免疫不全ウイルス）等のレトロウイルス、HAV（A



型肝炎ウイルス)等のピコーナウイルスにも存在が確かめられている(H.-G. Krausslich and E. Wimmer, Ann. Rev. Biochem. 57, 701, (1988))。HIV、あるいはフラビウイルスに属する黄熱病ウイルス(T. J. Chambers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898 (1990))では、ウイルスプロテアーゼ阻害によってウイルスの感染性が失われことが明かにされている。HCVに於ては上記のごとく遺伝子解析によってプロテアーゼの存在が予測されていたが、実際にプロテアーゼ活性を確かめたのはウイルス遺伝子DNAの無細胞転写翻訳実験あるいは動物細胞(M. Hijikata et al., J. Virol., 67, 4665 (1993), A. Grakoui et al., J. Virol., 67, 2832 (1993))または大腸菌内での一過性の発現系においてである。

【0004】これに対して、単離精製した酵素を用いてプロテアーゼ活性を測定する酵素反応系は、操作性の良さ、定量性が期待できる。特平表5-507612号には、単離精製した酵素を用いたアッセイの可能性が示唆されているが、内容は予備的であり、新規酵素として必要な要件を満たしていない。即ち、酵素の物質としての特性、アミノ酸配列の特定、酵素の作用としての切断部位の特定、あるいは力価の測定法等も示されていない。

【0005】本発明者らは先の特許出願(特願平5-18854号)において、単離精製したNS3酵素を用いたアッセイの可能性を示すとともに、酵素特性、切断部位を明かにした。ここでNS3酵素とは、HCVの非構造タンパク質領域のNS3領域に存在するプロテアーゼをいう(図1参照)。しかし、NS3のみの発現による酵素は不安定で活性も低く、より安定で切断活性の高い酵素が望まれている。

【0006】一方、酵素の活性に寄与する他の蛋白の可能性として、Failla等はHela細胞においてNS3のみではなくNS4Aを発現することがNS3/NS4A、NS4B/5Aの切断には必要であり、又、NS4Aの発現によりNS4A/4B、NS4B/5Aの切断も加速されると報告している(J. Virol., 68, 3753-3760 (1994))。しかしこのような動物細胞発現系では、上記のごとく操作性や定量性の点で各種の問題を有する。即ち、細胞培養系によるプロテアーゼ阻害剤のアッセイは酵素反応系に比べて、操作性の点で以下の欠点をもつ：

1. Failla等の方法によるアッセイを行うには、
  - i) Hela細胞を $4 \times 10^5$  cells / plateまで前培養する(1日～7日)
  - ii) Hela細胞にワクシニアウイルスを吸着させる(～2時間)。
  - iii) 発現ベクターのトランスフェクションする(～1時間)
  - iv)  $^{35}$ S-メチオニンでラベルする(～1時間)
  - v) 3時間後細胞を回収する

vi) 蛋白をイムノプレシピテーションする、ことが必要であり、以上の手順で少なくとも2日を要する。

2. 細胞培養用の培地、血清、使い捨て器具を含めて消耗品に費用がかかる。

3. 無菌操作等の操作が煩雑であり、熟練を要する。

4. 細胞の操作にクリーンベンチ、組換え実験にはそれに適した施設が必要である。

【0007】また、感度、定量性については以下の欠点を有する：

10 1. 細胞で発現される微量の蛋白の検出をするため、放射性同位体か同等の高い感度を有する検出方法を用いなければならない。

2. 結果が細胞の状態に大きく依存し、アッセイ間で値がばらつく。

3. 酵素反応の量的および時間的コントロールが困難である。即ち酵素および基質の細胞で生合成され、酵素反応が引き続いて起こり、生合成と酵素反応がほぼ平行して起こっている為、酵素及び基質の量、酵素反応の開始の時点を決めにくい。

20 4. 細胞に含まれる未知の因子の関与を否定するための、数多くのコントロール実験が必要である。

【0008】したがって、より簡単な操作で、定量性に優れたHCVプロテアーゼ活性の測定法が求められている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】感染性のあるHCVの産生にはウイルス蛋白のプロセッシングが必須であると考えられる。したがって、HCV非構造蛋白のプロセッシングに必須のウイルスプロテアーゼの阻害は、HCV感染を阻止すると考えられ、したがって副作用の少ない有効な抗HCV剤となる可能性を有している。このような阻害剤開発には、効率のよいHCVプロテアーゼ活性の測定法の確立が不可欠である。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記従来技術のもつ欠点を克服して効率のよいHCVプロテアーゼ活性測定法を完成させるべく鋭意研究した結果、HCVプロテアーゼとして従来必要十分と考えられていたNS3領域のみでなく、NS3より下流域を同時に大腸菌で発現し、簡便な精製法で単離することにより、安定で切断活性の高い単離酵素を大量に得ることができた。また、HCVプロテアーゼの切断部位近傍の合成ペプチドを基質として用い、上記酵素と組み合わせることにより、操作性および定量性に優れた測定法を完成することに成功した。また、本発明のHCVプロテアーゼ活性の測定法はプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングにも有用である。

【0011】すなわち、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合により



それより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させることからなる、HCVプロテアーゼ活性の測定法を提供する。

【0012】さらに、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させる系において、反応系に試験化合物を添加し、該合成基質ペプチドの切断反応の進行を、試験化合物添加のものと添加しないものとで比較することからなる、HCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法を提供する。

【0013】本発明の測定法およびスクリーニング法では細胞培養系を使用せず、試験管内で、単離精製したHCVプロテアーゼと合成基質ペプチドを使用する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明において、発現させるHCVプロテアーゼ領域としてはNS3およびNS4Aを含む領域であれば、いかなる箇所でもよい。したがって、発現させるHCVプロテアーゼ領域としては、

- i) NS3領域およびNS4A領域を含む領域、
- ii) NS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域、
- iii) NS3領域、NS4A領域、NS4B領域およびNS5A領域を含む領域、あるいは
- iv) NS3領域、NS4A領域、NS4B領域、NS5A領域およびNS5B領域を含む領域、

が含まれる。又、HCVにはいくつかのサブタイプが知られているが、いずれのサブタイプのアミノ酸配列を用いてもよい。

\*【0015】上記のHCV非構造領域遺伝子に相当するcDNA断片の構成および構築は先の特許出願の明細書(特願平5-18854号)、及びJ.Virol., 67, 4665 (1993)、あるいはProc.Natl. Acad.Sci. USA, 90, 10773(1993)に述べる方法によって実施できる。

【0016】HCVプロテアーゼは上記遺伝子を用い、大腸菌、動物細胞、昆虫細胞、ウサギ網状赤血球溶血液などで発現させることができる。

【0017】これらのHCVプロテアーゼを発現させる発現ベクターは、効率よく融合蛋白の発現できるものならばいかなるものでもよい。例えば、pTZ18、pTZ19、pUC18、pUC19、Bluescript KS、SK、pHSG398、pRSET、pGEX-2T、pRIT2Tなどが挙げられる。発現したプロテアーゼの安定性を増し、精製が容易に行えるように、プロテアーゼのアミノ酸末端側にマルトースバインディングプロテイン(MBP)との融合した状態で発現するpMAL-cなどが好ましい。発現に用いる大腸菌株としてはHB101、TB1、JM105などを用いることができるが、組換えプラスミドの変異が起こりにくいrecA<sup>-</sup>の菌株JM109が好ましい。

【0018】基質として用いる合成ペプチドは、HCVプロテアーゼの切断部位として特定されているNS3/NS4A、NS4A/NA4B、NS4B/NS5A、NS5A/NS5Bの各切断部位近傍のアミノ酸配列を有しているものであればよく、これらのコンセンサスなアミノ酸以外の1または2以上のアミノ酸を置換、欠失または付加してもよい。コンセンサスなアミノ酸とはNS3/NS4A、NS4A/NA4B、NS4B/NS5A、NS5A/NS5Bの各切断点近傍のアミノ酸配列に保存されたアミノ酸のことである。即ち、以下の表I中の下線で示したアミノ酸のことである。

\*【0019】

表I

HCVサブタイプ	配列	HCV中の部位
H-FDA	CMSAD <u>LEVVT</u>	NS3 / NS4A
H-AP	CMSAD <u>LEVVT</u>	
HCV-1	CMSAD <u>LEVVT</u>	
HCV-J	CMSAD <u>LEVVT</u>	
HCV-BK	CMSAD <u>LEVVT</u>	
HC-J6	CMQAD <u>LEVMT</u>	
HCV-T	CMSAD <u>LEVVT</u>	
HC-J8	CMQAD <u>LEIMT</u>	
HCV-JT, JT'	CMSAD <u>LEVVT</u>	NS4A / NS4B
H-FDA	YQEF <u>DEMEEC</u>	
H-AP	YQEF <u>DEMEEC</u>	
HCV-1	YREF <u>DEMEEC</u>	
HCV-J	YQEF <u>DEMEEC</u>	
HCV-BK	YQEF <u>DEMEEC</u>	
HC-J1, J4	YEA <u>FDEMEEC</u>	
HCV-T	YQEF <u>DEMEEC</u>	





7			8
HC-J8	YQAFDEMEEC	ASKAALIEEG	
HCV-JT, JT'	YREFDEMEEC	ASHLPYIEQG	
H-FDA	WISSECTTPC	SGSWLRDIWD	NS4B / NS5A
H-AP	WISSECTTPC	SGSWLRDIWD	
HCV-1	WISSECTTPC	SGSWLRDIWD	
HCV-J	WINEDCSTPC	SGSWLKDVWD	
HCV-BK	WINEDCSTPC	SGSWLRDVWD	
HC-J1, J4	WITEDCPIPC	SGSWLRDVWD	
HCV-T	WINEDCSTPC	SGSWLRDVWD	
HC-J8	WITEDCPVPC	SGSWLQDIWD	
HCV-JT	WINEDCSTPC	SGSWLKDVWD	
HCV- JT'	WINEDCSTPC	SGSWLRDVWD	
H-FDA	GADTEDVVCC	SMSYTWGAL	NA5A / NS5B
H-AP	GADTEDVVCC	SMSYSWTGAL	
HCV-1	EANAEDVVCC	SMSYSWTGAL	
HCV-J	GEAGEDVVCC	SMSYTWGAL	
HCV-BK	EEASEDVVCC	SMSYTWGAL	
HC-J6	SEEDDSVVCC	SMSYSWTGAL	
HCV-T	EEDGEVVICC	SMSYTWGAL	
HC-J8	SDQEDSVICC	SMSYSWTGAL	
HCV-JT, JT'	GEASDDIVCC	SMSYTWGAL	
コンセンサス	D C S		
	E T A		

(Grakoui, et al., J. Virol., 67, 2832(1993))

【0020】上記コンセンサスなアミノ酸DまたはE、CまたはT、ならびにSまたはAは各位置で自由に組み合わせることができる。すなわち、上記のD、C、SやE、T、Aの組み合わせのみでなく、D、T、SやE、C、Sの組み合わせであってもよい。

【0021】合成ペプチドの長さは5～25アミノ酸がよいが、好ましくは、10～20アミノ酸である。例えば、YQEFDEMEEC ASHLPYIEQG、WINEDCSTPC SGSWLKDVWD、GEAGDDIVCC SMSYTWGAL等があげられる。最も好ましいものは、GEAGDDIVPC SMSYTWGAL、GEAGDDIVPC SMSYTW T、DDIVPC SMSYTW、DDIVPC SMSYTであり、これらは大腸菌内で切断反応が最も速く進行するNS5A / NS5Bの切断点を含むアミノ酸配列をほぼ有している。しかも本来のアミノ酸配列GEAGDDIVCC SMSYTWGALでは、隣り合った2つのシステインが速やかにジスルフィド結合を形成して酵素反応を受けない化合物になる欠点を、P2をプロリンに変換することによって改良したものである。P2位のプロリンは天然型 NS4B / NS5A切断点に存在しており、HCVプロテアーゼの天然型切断点の認識になんら支障を与えるものではないのみならず、ペプチドの溶解性を高める。

【0022】また、これらのペプチドのN末端あるいはC末端を蛍光、発光、発色基、アフィニティリガンド、抗原などでラベルすることができる。例えば、N末端を蛍光試薬のダンシル基(Dns-)、FITC基でラベルしたものはHPLC検出で感度よく夾雑物の干渉なくペプチドの

シグナルを検出することができる。又、アフィニティリガンドであるビオチンをN末端あるいはC末端ラベルし、アビジンコートしたマイクロタイタープレートに固定化し、ELISA法で検出が行なえる。または、ABC法で検出することもできる。さらに、抗原であるジゴキシゲニン(Dig)でN末端あるいはC末端をラベルすれば、抗Dig抗体で検出できる。

【0023】酵素反応の条件として、pHは5～10で行なうことができるが、好ましくはpH7～8である。二価のイオンとして、カルシウム、マグネシウム、マンガンを加えることができる。反応温度は0～90℃で行なうことができるが、好ましくは25～60℃である。

【0024】反応の検出はHPLC、TLC、ELISA法を用いることができる。

【0025】反応は経時的に進行し、

- 40 i) NS 3領域およびNS 4 A領域を含む領域、
  - ii) NS 3領域、NS 4 A領域およびNS 4 B領域を含む領域、
  - iii) NS 3領域、NS 4 A領域、NS 4 B領域およびNS 5 A領域を含む領域、および
  - iv) NS 3領域、NS 4 A領域、NS 4 B領域、NS 5 A領域およびNS 5 B領域を含む領域、
- を発現させたHCVプロテアーゼのいずれを用いても2時間後には基質の90%以上が切断された。これに対してNS 3領域のみを発現させたHCVプロテアーゼを用いた場合には反応の進行が他のプロテアーゼに比べて著



しく遅かった(図3および表2参照)。

【0026】さらに、このような本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法を用いてプロテアーゼ阻害剤をスクリーニングすることができる。上記したHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させる系において、反応系に阻害剤の候補となる試験化合物を添加し、該合成基質ペプチドの切断反応の進行を、試験化合物添加のものと添加しないものとで比較することによってスクリーニングを行うことができる。本発明のスクリーニング法においては、実施例4に示すように、酵素反応液に試験化合物を加えて、37℃15分ブレインキュベーションし、次いでN末端を蛍光標識したペプチド基質を添加して37℃で10分反応させる。その後、90℃5分加熱して反応を止め、氷上保存して測定できる。したがって、1時間以内で測定を完了することができ、上記した細胞培養系に比べて極めて短時間で測定を行うことができる。また、無菌操作などの煩雑な操作を伴わず、使用する施設も簡単なものでよい。さらに、細胞を用いないので、細胞培養系に比べて測定間のバラツキがなく、信頼のおける結果が得られる。放射性同位体などの検出方法を用いる必要がない点も本発明の利点である。

【0027】本発明の別の態様では、本発明は、以下の工程からなるHCVプロテアーゼ活性の測定法を提供する：

(1) C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、ビオチンまたは抗原物質または抗体物質で標識(標識a)した合成基質ペプチドとを反応させる；

(2) 工程(1)の切断産物である標識ペプチドを、さらに抗原物質で標識(標識b)する；

(3) ペプチドに標識した前記抗原物質に、前記抗原に対する酵素標識抗体を結合する；そして

(4) 工程(3)の酵素の活性を測定する；ただし、工程(2)、工程(3)または工程(4)の前に、標識aに対する親和性を利用して標識ペプチドの固定化を行う。

【0028】この方法は、HCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングなどのように、多数の試料についてその活性を測定しなければならない場合において、処理能力の高いELISA法の汎用性を高め、基質の変化に容易に対応できる点で有用である。この方法は、従来のELISA法に先立って、酵素反応後、生成物に抗原物質を結合させるポストラベル法である。

【0029】上記方法で使用する合成基質ペプチドは、プロテアーゼ切断で生じたアミノ基に対して特異的に標識反応を行うため、このアミノ基以外に反応しうるアミノ基が存在してはならない。また、標識反応で得ら

れた反応生成物を固定化するために、合成基質ペプチドの切断部位のC末側またはN末側をビオチンまたは抗原物質または抗体物質であらかじめ標識しておく必要がある(この標識を標識aという)。このような条件を満たす限り、基質ペプチドのアミノ酸配列は、酵素の基質特異性の範囲内で自由に設計することができる。

【0030】しかし、以下の実施例に示すように基質ペプチド中にシステインが含まれている場合には、切断反応で生じたアミノ基以外に、システインのチオール(SH)基も抗原物質で標識されることがある。このような基質ペプチドを用いる場合には、アミノ基に対する標識反応に先立って、システインのチオール基を修飾してチオール基が抗原物質で標識されないようにしなければならない。チオール基の修飾剤としては、その後のアミノ基に対する標識反応を阻害せず、さらにその後の処理にも影響しないものであれば、特に限定されない。好ましいチオール基の修飾剤は、N-メチルスクシミド、N-エチルスクシミドなどのN-アルキルスクシミド、およびヨード酢酸、ヨード酢酸ナトリウムを含む。ヨード酢酸、ヨード酢酸ナトリウムは水に対する溶解度が高いため特に好ましい。これらの修飾剤は、水または緩衝液、アルコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの溶液として用いる。反応条件は特に限定されないが、反応温度として室温〜50℃、反応時間として30分〜60分の範囲で十分である。チオール基修飾剤の量は、試料中に含まれるチオール基に対して、上記の反応条件下で完全に修飾反応が進行すればよく、特に制限はない。

【0031】次いで、上記反応での切断産物である標識ペプチドをさらに抗原物質で標識する(この標識を標識bという)。例えば、標識aを基質ペプチドの切断部位のN末側に付けた場合には、標識bをカルボキシル基に対して行う。

【0032】抗原物質としては、それに対する抗体を作製できる物質であれば、その種類は限定されない。この抗体は通常のELISAでの二次抗体に相当するものであり、実際の使用に際しては検出反応に用いる酵素で標識しなければならないため、入手の容易さから、既に酵素標識された抗体が市販されているジゴキシゲニンが適している。しかしながら、ジゴキシゲニン自体はアミノ基と反応しないため、アミノ基をジゴキシゲニンで標識するために、ジゴキシゲニンをアミノ基の修飾剤であるヒドロキスクシミド化しなければならない。すなわち、アミノ基に対する標識反応は、ジゴキシゲニン-3-O-メチルカルボニル-ε-アミノカプロン酸-N-ヒドロキスクシミドエステル(以下、DIG-NHSという)などのジゴキシゲニン標識試薬を用いて行う。DIG-NHSの溶剤としては、水と完全に混和し、DIG-NHS自身と反応しないものであれば、特に限定されない。ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミ



ドが好ましい。反応温度は特に限定されないが、室温～50℃の範囲で十分である。また、反応時間も特に限定されないが、30分～60分で十分である。DIG-NHSの濃度は特に限定されないが、反応温度、反応時間、および使用量に応じて、0.01～1mg/mlの範囲で使用可能である。

【0033】ジゴキシゲニンの標識反応には過剰量のDIG-NHSを用いるため、次の工程（固定化、酵素反応）以降の支障とならないように、未反応のDIG-NHSの不活化処理を行う。不活化処理は、過剰量のアミノ基を有する物質を加えてDIG-NHSと反応させることによって実施できる。このような物質としては、一級アミノ基を有し、水溶性の物質であれば特に限定されない。好ましい例として、アミノ酸およびその誘導体を挙げることができる。水溶液のpHは、微アルカリ性、好ましくはpH7.5～10の範囲である。濃度および使用量は、DIG-NHSの濃度および使用量に応じて変更でき、未反応のDIG-NHSと完全に反応すればよく、特に限定されない。また、反応条件も特に限定されないが、室温～50℃の範囲の温度で、30分～60分の時間で十分である。

【0034】以上の処理によりプロテアーゼ切断で生じた断片の末端アミノ基に対するジゴキシゲニンの選択的な標識が可能となる。

【0035】次いで得られたジゴキシゲニンで標識された切断断片を固定化する。ただし、請求の範囲に記載するように、固定化の時期はこの段階であっても、あるいは上述した標識bを行う前であっても、あるいは酵素活性の測定直前であってもよい。

【0036】固定化を行うには、標識aに対する親和性を利用する。例えば、標識aがビオチンである場合にはアビジンまたはストレプトアビジンを、標識aが抗原である場合には該抗原に対する抗体を、標識aが抗体である場合には該抗体に対する抗原を用いて担体に固定化を行う。担体としては固体担体が好ましく、例えば任意の大きさ、形状に成型されたスチレンやポリスチレンなどの高分子担体の他、これらの材料で成型した反応容器の内壁、具体的には標識aに対して親和性を示す物質（ストレプトアビジン、抗体、抗原）をコーティングしたチューブ、マイクロタイタープレート、ビーズ、カラム担体などを用いて行う。固定化は検出感度、基質量および反応液量に応じて、ジゴキシゲニン標識反応液の全量もしくはその一部を用いて行うことができる。その際、界面活性剤を含む緩衝液で希釈することも可能である。界面活性剤としては、ノニデット（Nonidet）P-40、ツイーン（Tween）20、トリトン（Triton）X-100などの非イオン性の界面活性剤が好ましく、その濃度は0.001～1%で十分である。固定化の温度および時間は特に限定されないが、温度は4℃（冷蔵庫内）～37℃の範囲で、時間は1～24時間

の範囲で行うことができる。

【0037】未反応の基質ペプチドおよび標識された切断生成断片の固定化を行った後、反応液中の酵素などの夾雑物を除くために洗浄を行う。洗浄液には、固定化のときに用いた希釈液の他に、生化学実験で汎用されているTBS（Tris Buffered Saline）やPBS（Phosphate Buffered Saline）などの緩衝液を用いることができる。

【0038】これ以降の操作は通常のELISAと同様に行うことができる。すなわち、洗浄後、ペプチドに標識した前記抗原物質に、前記抗原に対する酵素標識された抗ジゴキシゲニン抗体（以下、酵素標識抗体という）を結合させる。結合工程の前に、固定化に用いた器具表面での非特異的吸着を防ぐために、ブロッキング試薬による処理を行うことが好ましい。ブロッキング試薬として、ウェスタンブロット法などで用いるスキムミルク、カゼインなどを用いることができる。ブロッキング処理は、4℃～37℃の温度で、1～24時間の範囲で行うことができる。

【0039】基質ペプチドの切断断片に選択的に標識されたジゴキシゲニンに対する酵素標識抗体の結合は、標識されている酵素（標識酵素）の安定性にもよるが、4℃～37℃の温度で、1～数時間の範囲で行うことができる。通常、室温中、1時間で十分である。標識酵素には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼが多く用いられるが、特に限定されない。

【0040】結合しなかった余分の酵素標識抗体を除くために、TBSなどの緩衝液で洗浄する。その後、標識酵素に対する基質溶液を加えて、酵素反応を行う。酵素反応を酸またはアルカリによって停止させた後、酵素反応によって生じた生成物の吸光度または蛍光強度を測定する。

【0041】本発明によるこの方法を用いると、反応生成物をジゴキシゲニンなどの抗原物質で標識することによって従来のELISA法と同様の操作で測定できる。さらに、従来のELISA法では測定対象物質に対する抗体（一次抗体）が必要であったが、本発明の方法では測定対象物質に特異的な抗体を必要としないため、広範囲で使用可能である。

【0042】以下の実施例7～12では、HCVプロテアーゼとしてHCVのNS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域由来のプロテアーゼ（345Ps）、基質ペプチドとしてビオチン化（C末端リジンのε-アミノ基）およびアセチル化（N末端アミノ基）したAc·GEAGDDIVPCSMSYTWTK[Bio]を用いた例を示すが、本発明の方法はこの実施例に限定することなく、広く使用できる。

【0043】本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法およびプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを以下の実施例により詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定



されない。

#### 【0044】

##### 【実施例】

##### 実施例1：酵素発現ベクターの構築

HCV非構造領域遺伝子に相当するcDNA断片の構成および構築は先の特許出願の明細書（特願平5-18854号）、及びJ. Virol., 67, 4665 (1993)、あるいはProc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10773 (1993)に述べるとおりである。

【0045】pMANS2d3X：特願平5-18854号に述べるとおり、ベクターpMal-cにHCVのORF（オープンリーディングフレーム）上985-1325番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したものである。

【0046】pMANS34NsH：pTZ18にHCVのORF上722-1647番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN722-1647をSac II-Hind IIIで切断し、pMANS2d3Xの同じ制限酵素で切断したものに挿入し、pMANS34Nsを得た。これをEcoT22-Hind IIIで切断し、合成DNA断片を挿入し、pMANS34NsHを得た。

【0047】pMANS34Sm：pTZ18にHCVのORF上722-1908番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN722-1908をSac II-Hind IIIで切断してえたフラグメントを、pMANS2d3Xの同じ制限酵素で切断したフラグメントと置換し、pMANS34Smを得た。pMANS345C：pTZ18にHCVのORF上729-3010番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN729-3010をSac II-Sal Iで切断し、pMANS2d3Xの同じ制限酵素で切断したものに挿入し、pMANS345Cを得た。

【0048】pMANS345Bs：pTZ18にHCVのORF上722-2472番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN722-2472をPst I-Hind IIIで切断してえたフラグメントを、pMANS345Cの同じ制限酵素で切断したフラグメントと置換し、PMANS345Bsを得た。

【0049】pMANS345Ps：pMANS345CをPst Iで切断し、再び酵素的に結合し、小さなフラグメントを欠失させpMANS345Psを得た。

##### 【0050】実施例2：酵素の発現と精製

上記の発現ベクターで大腸菌株JM109コンピテント細胞を形質転換する。形質転換した大腸菌は50μg/μlアンピシリンを含むLB brothで一晩37℃前培養し、50μg/μlアンピシリンを含むLB brothで希釈し(20-30倍)、37℃約2時間培養した。濁度がOD<sub>600</sub> = 0.5~0.7になった時点で最終濃度0.5 mMのイソプロピルベータチオガラクトシドを加え、さらに20℃で3時間培養した後、培養液を遠心し菌体を集めた。菌体は-80℃の冷凍庫で保存した。

【0051】保存した菌体を培養液の1/10容のバッファーA(10 mM Na-リン酸バッファーpH7.2、30 mM NaCl、10 mM ベータメルカプトエタノール)に懸濁し、超音波破碎機で氷冷下10分細胞を破碎した。遠心分離して上清

を得、上清に70%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、蛋白を沈殿させた。沈殿を遠心分離で集め、上清の1/2容のバッファーAに溶解し、アミロース樹脂カラムにアプライした。カラムはバッファーAで洗浄後、バッファーB(10 mM Na-リン酸バッファー pH7.2、30 mM NaCl、10 mM ベータメルカプトエタノール、0.2% Tween 20)、バッファーC(10 mM Na-リン酸バッファー pH7.2、500 mM NaCl、10 mM ベータメルカプトエタノール)で洗浄した。カラムに結合した蛋白を10 mM マルトースを添加したバッファーAで溶出した。溶出した蛋白は限外濾過で濃縮し、最終濃度が50%になるようにグリセロール添加し、-20℃の冷凍庫で保存した。得られた酵素を分析した。即ち、得られた酵素標品をサンプルバッファーに溶解し、100℃5分加熱した後、SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし電気泳動後、クーマシーブリリアントブルーで染色した。あるいは電気泳動後、展開した蛋白をPVDF膜にトランスファーし、抗NS3抗体および抗MBP抗体でウエスタンブロットした。

##### 【0052】実施例3：基質ペプチドの合成

ペプチドDns-GEAGDDIVPC SMSYTWGTAL、Dns-GEAGDDIVAC SMSYTWGTAL、Dns-GEAGDDIVPN SMSYTWGTAL、Dns-GEAGDDIVP(D)C SMSYTWGTAL、Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWGT、Dns-GEAGDDIVPC SMS、Dns-GEAGDDIVAC SMS、Dns-GEAGDDIVCC SMS、Dns-DDIVPC SMSYT、Dns-DDIVPC SMS、Dns-DDIVPC SMSYTWGT、Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTK、Dns-GEAGDDIVSC SMSYTWGTAL、Dns-WINEDCSTPC SGSWLKDVWP、Dns-YQEFDEMEEC ASHLPYIEQGはペプチド合成機を用いて固相法で行なった。すなわち、αアミノ基をt-ブチルオキシカルボニル基で保護し、側鎖のカルボキシル基をシクロヘキシル基、水酸基をベンジル基、チオール基をメチルベンジル基、そしてεアミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護した第2アミノ酸を、カルボキシル基が樹脂に結合したαアミノ基が無保護の第1アミノ酸にジシクロヘキシルカーボジイミドを用いて縮合した後、αアミノ基の保護をトリフロロ酢酸で除去した。第3以下のアミノ酸についても同様にして順次C端からN端へ合成した。全鎖合成後αアミノ基の保護をトリフロロ酢酸で除去し、ダンシルクロリドで修飾し、樹脂からの切り出しと脱保護をフッ化水素で行ない上記各ペプチドを得た。

【0053】Ac-GEAGDDIVPC SMSYTWTK-Bioは、αアミノ基を保護し、樹脂に固相化したリジンのεアミノ酸をビオチン化し、保護したアミノ酸を用いて固相合成後、N末端をアセチル化した後に脱保護した。

【0054】Dig-GEAGDDIVPC SMSYTWTK-Bioは同様な固相合成、脱保護の後ジスルフィド結合を形成させ、N末端アミノ基の標識をジゴキシングニン-3-O-サクシニル[2-(N-マレイミド)]エチラミド(Digoxigenin-3-O-succinyl-[2-(N-maleimido)]-ethylamid o)で行ないDTTでジスルフィド結合を切断し得た。





## 【0055】実施例4：酵素反応

標準的な酵素反応は以下のような条件で行った。50 mM Tris HCl pH 7.6、30mM NaCl、10 mM DTT、酵素蛋白4  $\mu\text{g}$  - 8  $\mu\text{g}$ を含む酵素反応液100  $\mu\text{l}$ に、DMSOあるいは水溶液で溶解した試験化合物を最終濃度が1 - 10  $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、37℃15分ブレインキュベーションし、HPLC法ではN末端を蛍光標識したペプチド基質 (DM SO溶液) 最終濃度86  $\mu\text{M}$  (最終DMSO濃度：2%) を添加して反応を開始した。37℃で反応した後、90℃5分加熱して反応を止め、氷上保存した。ELISA法では、Nある

## 【0056】実施例5：検出

## (1) HPLC法

反応液5  $\mu\text{l}$ をとり、逆相HPLC ( $\phi$ 4.6 mm x 15 cm) にアプライした。カラムは50 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.5) 中 22.5% →60%のアセトニトリルの直線濃度勾配 (10分) で溶出し、未反応のペプチド基質と切断産物のN末端側断片の蛍光シグナルをexcitation: 340 nm、emission: 510 nmで検出した。切断率は両者の面積の比から求めた。

## 【0057】(2) ELISA法

N末端にジゴキシゲニン (Dig) で標識し、C末リジンの側鎖のアミノ基をビオチン (Bio) 標識した基質Dig-GEAGDDIVPC SMSYTWTK-Bioを酵素反応した後、反応液1  $\mu\text{l}$ をとり、2% 2-メルカプトエタノールと0.01% NP-40を加えた磷酸緩衝液 (pH8.5) で2000倍に希釈し、10  $\mu\text{l}$ をストリプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレートに加えた。室温1時間放置後、プレートを洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗Dig抗体と室温1時間反応した。プレートを洗浄後、アルカリフォスファターゼ基質2, 2'-アジド-ジ-(3-エチルベンズチアゾリンサルフェート) (2, 2'-Azido-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfate)) 溶液200  $\mu\text{l}$ を加え室温10分反応し、1 N NaOH 50  $\mu\text{l}$ を加え反応を停止した。405 nmの吸光度を測定し、残存Dig量を検出した。

## 【0058】実施例6：結果

## (1) 酵素の名称

上記のように発現プラスミド pMANS34NsH、pMANS34Sm、\*

表II

	V <sub>max</sub> (n mol/hr $\mu\text{g}$ Enz)	K <sub>m</sub> (mM)
34NsH	0.926	0.126
34Sm	3.44	0.122
345Ps	8.45	0.144
345Bs	8.62	0.180
345C	7.57	0.24

## 【0064】(5) 阻害剤の効果

実施例4に記載の方法を用いて、セリンプロテアーゼ阻

\* pMANS345C、pMANS345Bs、pMANS345Ps を大腸菌に感染させ、マルトース結合蛋白と融合蛋白として発現し、アミロース樹脂で精製した酵素をそれぞれ34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Psと称する。図1に各々発現プラスミドの名称と挿入したHCV遺伝子の領域をしめす。

## 【0059】(2) 酵素反応の検出

酵素345Ps 0.04  $\mu\text{g}$ と合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTを上記の条件で反応したときのHPLCのクロマトグラムを図2に示す。未反応の基質は保持時間7~8分に、切断を受けた産物は保持時間3~4分にそれぞれに溶出された。この時切断率は24%であった。

## 【0060】(3) 時間反応曲線

34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Ps各0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を上記の反応条件で合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTと反応させた時間反応曲線を図3に示す。反応は経時的に進行し、2時間後には34Sm、345C、345Bs、345Psでは基質の90%以上が切断された。しかし、34NsHでは反応の進行は他の酵素の比ベ著しく遅かった。

【0061】次いで切断された反応液中のペプチドのN末端をアミノ酸シーケンサーで分析した。未切断の基質および切断産物のN端側の断片はダンシル基でアミノ末端が保護され、分析されず、切断産物のC端の断片のN末端からのアミノ酸配列が分析できるが、結果は期待されたとおりのSMSYTWTのアミノ酸配列であり、切断が正しい切断部位で起こっていることを確認した。

## 【0062】(4) 反応速度

34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Psの反応速度を比較した。反応条件は酵素 0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、標準溶液 (50 mM Tris HCl (pH7.6), 30 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM DTT) 中、37℃でブレインキュベーション 30分後、0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の基質をいれ、37℃10分反応した。反応は70℃5分加熱して止めた。得られた結果を以下の表IIに示す。表IIから明らかなように、切断活性は345Ps、345Bsが最高であり、345C、34Smの順であった。34NsHはこれらに比し著しく低かった。

## 【0063】

## 【表1】

害剤の一つであるPMSF (フェニルメタンスルフォニルフロリド) のプロテアーゼ活性に及ぼす効果を調べた。酵



素には345Psを、基質には Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWT を用い、1mM および 10mM 濃度のPMSF の効果を検討した。対照としてプロテアーゼ活性をもつトリプシンを用いた。

【0065】得られた結果を図4に示す。プロテアーゼ活性は、トリプシンと同様に10mM PMSFで阻害を受けたが、その程度はトリプシンより小さかった。

#### 【0066】実施例7：チオール基修飾

実施例4に記載の方法によって得られた反応液（反応時間：3時間）を試料として用いた（この反応液には、H 10 PLC分析により未反応基質の存在は認められなかった）。

#### 【0067】（1）チオール基の修飾

5  $\mu$  l のN-エチルマレイミド（100mM、エタノール溶液）に1  $\mu$  l の反応液を加え、攪拌後、室温（23℃）で30分、チオール基の修飾反応を行った。これに 5  $\mu$  l のDIG-NHS（ペーリンガー・マンハイム社製：0.4mg/ml、ジメチルスルホキシド溶液）を加え、攪拌した後、さらに室温で30分反応を行った。次いで10  $\mu$  l のグリシン水溶液（500mM、水酸化ナトリウムでpHを8.5に調節）を加えて、さらに室温で90分反応を行った。このようにして得られた反応液に、100  $\mu$  l の固定用希釈液（50mM、リン酸緩衝液（pH8.5）、0.01%ノニデットP-40）を加えて攪拌した。

#### 【0068】（2）プレートへの固定

表III

チオール基修飾の効果（吸光度）			
修飾	反応液	未反応液	TBS
有	1.583	0.243	0.234
無	1.752	1.071	0.230

#### 【0071】実施例8：反応生成物量と吸光度との関係（1）

実施例7で用いた反応液および未反応液のそれぞれを等量のジメチルスルホキシドで希釈した後、ビオチン量が一定になるように両者を種々の割合で混合した。得られた混合試料の1  $\mu$  l を用いて、実施例7と同様の操作を行った（室温：23℃）。ただし、N-エチルマレイミド処理およびジゴキシゲニン標識反応は37℃で行った。得られた結果を図5に示す。

#### 【0072】実施例9：反応生成物量と吸光度との関係（2）

実施例7で用いた反応液および未反応液のそれぞれを2倍量のジメチルスルホキシドで希釈した後、ビオチン量が一定になるように両者を種々の割合で混合した。マイクロタイタープレートに2  $\mu$  l の混合試料を入れ、実施例7と同様の操作を行った（室温：23℃）。ただし、N-エチルマレイミドの代わりにヨード酢酸ナトリウム（100mM、TBSに溶解）を用い、DIG-NHSの濃度は0.2mg/mlとした。チオール基の修飾反※50

\*（1）の全量をストレプトアビジン・コーティド・マイクロタイタープレート（ペーリンガー・マンハイム社製）に入れ、攪拌し、室温で放置した。1時間後、内容物を捨て、350  $\mu$  l の固定用希釈液、TBSで順次洗浄した。300  $\mu$  l の50%ブロックエース（大日本製薬（株）社製：TBSで希釈）を加え、1時間放置した。内容物を捨て、300  $\mu$  l のTBSで2回洗浄した。

#### 【0069】（3）抗ジゴキシゲニン抗体およびアルカリホスファターゼによる標識

（2）で得られたプレートに200  $\mu$  l のアルカリホスファターゼ標識の抗ジゴキシゲニン抗体（ペーリンガー・マンハイム社製：TBSで1000倍に希釈：0.75U/ml）を加え、1時間放置した。300  $\mu$  l のTBSで2回洗浄した後、アルカリホスファターゼの基質として200  $\mu$  l のp-ニトロフェノールリン酸2ナトリウム溶液（2.5mg/ml：100mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.8）、2mM塩化マグネシウム）を加え、室温（23℃）で15分反応を行った。50  $\mu$  l の水酸化ナトリウム（1N）を加えて反応を停止させ、吸光度（405nm）を測定した。同様の処理を未反応液（基質溶液）およびTBSを用いて行った。さらに、チオール基の修飾としてのN-エチルマレイミド処理を行わない場合についても、同様の操作を行った。得られた結果を表IIIに示す。

#### 【0070】

※応およびジゴキシゲニン標識反応は37℃で30分、グリシン処理は37℃で45分を行った。また、アルカリホスファターゼの発色時間は10分とした。得られた結果を図6に示す。

#### 【0073】実施例10：測定値のバラツキ

反応液および未反応液のそれぞれを4倍量のジメチルスルホキシドで希釈した後、ビオチン量が一定になるように両者を種々の割合で混合した。得られた混合試料の2  $\mu$  l を用いて、実施例9と同様の操作を行った（室温：23℃）。ただし、ヨード酢酸ナトリウム処理およびジゴキシゲニン標識反応は37℃で35分、グリシン処理は15  $\mu$  l のグリシン溶液を加え、37℃で40分を行った。ストレプトアビジン・コーティド・マイクロタイタープレートへの固定化は、100  $\mu$  l の固定用希釈液を入れ、この中に10  $\mu$  l のグリシン処理反応液を加えた。また、アルカリホスファターゼの発色時間は15分とした。得られた結果を表IVに示す。

#### 【0074】



表IV

測定値(吸光度)のパラツキ(n=6)

反応液	未反応液	最小値	最大値	平均値	誤差( )
0	10	0.236	0.268	0.245	0.048
1	9	0.339	0.412	0.375	0.061
2	8	0.429	0.523	0.482	0.062
3	7	0.566	0.668	0.604	0.059
4	6	0.705	0.789	0.756	0.037
5	5	0.886	1.019	0.948	0.043
-----	-----	-----	-----	-----	-----
0	0	0.224	0.235	0.229	0.016

\*:標準偏差/平均値

【0075】実施例11:プロテアーゼ阻害剤を含む場合

プロテアーゼ阻害剤としてPMSF(フェニルメタンスルホニルフルオリド)処理を行った酵素反応液を用いた。反応停止は4倍量のジメチルスルホキシドを加えた。1 $\mu$ lの停止反応液を用いて、実施例10と同様な操作を行った。得られた結果を表Vに示す。

【0076】表V

PMSFによる阻害

PMSF濃度	活性(切断%)
10mM	71
1mM	87
0mM	100

【0077】実施例12:測定の適応範囲

試料として、基質ペプチドの切断断片のSMSYTWT K[Bio]を用いた。2 $\mu$ lの試料溶液(ジメチルスルホキシドに溶解したもの)に対して、実施例10と同様に、ヨード酢酸ナトリウム処理(37℃、30分)、ジゴキシゲニン標識(37℃、30分)、およびグリシン処理(37℃、40分)を行い、その10 $\mu$ lを固定化した。発色反応は室温(24、5℃)で10分を行った。これらの操作を種々の濃度で行い、その結果を図7に示す。

【0078】

【発明の効果】本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法は、試験管内で実施することができるので、細胞培養系に比べて極めて短時間で測定を行うことができる。また、無菌操作などの煩雑な操作を伴わず、使用する施設も簡単なものでよい。さらに、細胞を用いないので、細胞培養系に比べて測定間のバラツキがなく、信頼のおける結果が得られる。放射性同位体などの検出方法を用いる必要がない点も本発明の利点である。また、本発明のHCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法を用いると、極めて簡単かつ確実に阻害剤のスクリーニングを行うことができ、抗HCV剤の開発におおいに利用でき \*

＊る。

【0079】さらに、発色原子団を遊離させることによって活性測定が困難なプロテアーゼに対しては、酵素反応後に生成物に抗原物質を結合させるポストラベル法によるELISA法を用いる本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法が有利である。この測定法は基質の変化に容易に対応でき、極めて応用範囲が広い。

20 【図面の簡単な説明】

【図1】HCV前駆体ポリプロテイン構造、および本発明で使用した発現プラスミドの名称とそれぞれに挿入したHCV遺伝子の領域を示す。なお、図中、アミノ末端側のCはウイルスコアタンパク質、E1およびE2はエンベロープタンパク質1および2を表し、これらはウイルス構造タンパク質に相当する。それより下流領域からの産物はウイルス複製に機能する非構造タンパク質(NS)に相当する。

30 【図2】酵素345Psと合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTを反応させたときのHPLCのクロマトグラムである。

【図3】酵素34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Psを合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTと反応させたときの時間反応曲線を示す。

【図4】酵素345Ps、合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTを用い、阻害剤としてPMSFを添加したときの効果、ならびに同濃度のPMSF存在下におけるトリプシンの基質N-ベンゾイルFVR(Ph-e-Va-l-A-r-g)-p-ニトロアニリド切断反応の結果を示す。

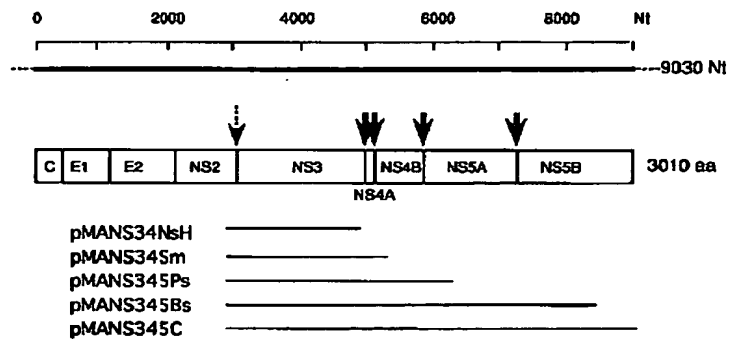
【図5】N-エチルマレイミド処理を行った場合の反応生成物量と吸光度(405nm)との関係を示す。

【図6】ヨード酢酸ナトリウム処理を行った場合の反応生成物量と吸光度(405nm)との関係を示す。

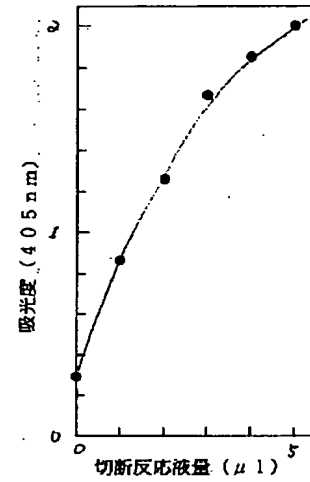
【図7】ヨード酢酸ナトリウム処理を行った場合の測定適応範囲を示す。



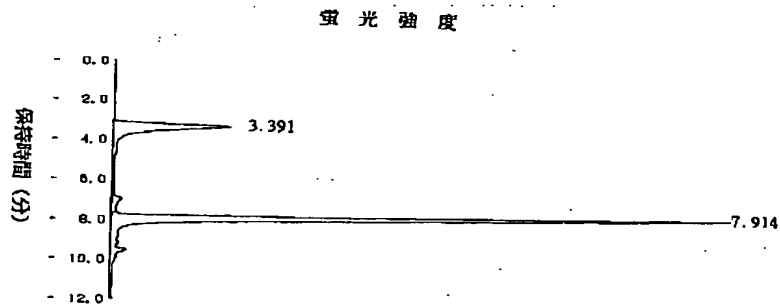
【図1】



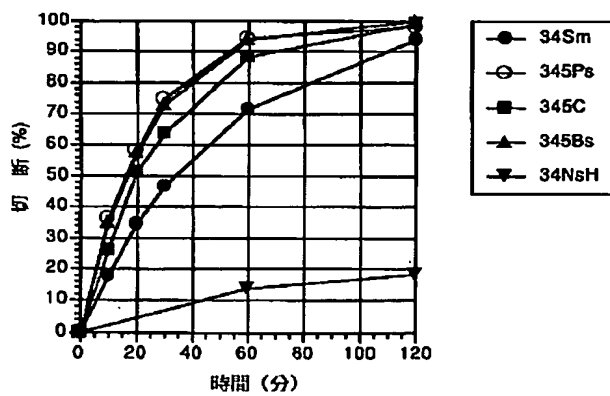
【図6】



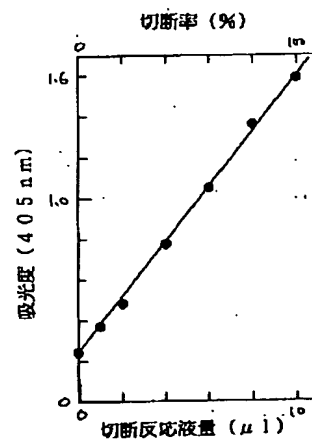
【図2】



【図3】



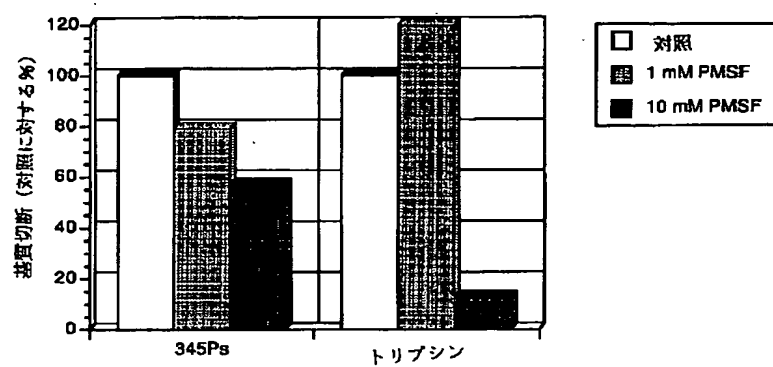
【図5】



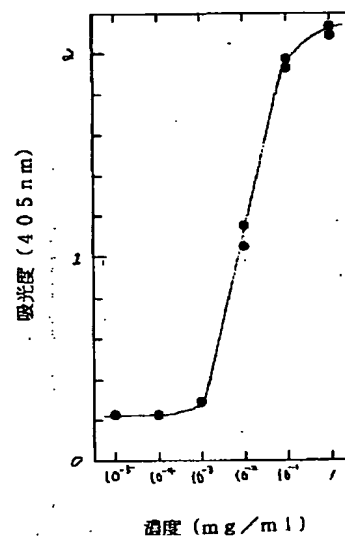




【図4】



【図7】





記事番号 0004

引用文献 ③

## Two Novel Testicular Serine Proteases, TESP1 and TESP2, Are Present in the Mouse Sperm Acrosome

Nobuhisa Kohno,<sup>\*</sup> Kazuo Yamagata,<sup>\*</sup> Shigehiro Yamada,<sup>\*</sup> Shin-ichi Kashiwabara,<sup>\*</sup>  
Yasuhiro Sakai,<sup>†</sup> and Tadashi Baba,<sup>\*1</sup>

<sup>\*</sup>Institute of Applied Biochemistry and Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba and the National Institute for Advanced Interdisciplinary Research (NAIR), Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8572, Japan; and <sup>†</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Kitasato University, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555, Japan

Received March 4, 1998

To identify a novel candidate(s) for acrosomal proteases that act on the sperm/egg interaction, a DNA fragment was PCR-amplified from a cDNA library of acrosin-deficient mouse testis and then used as a probe to screen a mouse testis cDNA library. Complementary DNA clones encoding each of two similar but different serine proteases, TESP1 and TESP2, have been identified. The nucleotide sequences of these clones indicate that mouse TESP1 and TESP2 are initially synthesized as preproteins of 367 and 366 amino acids, respectively. Comparison of the two TESP sequences with those of typical serine proteases suggests that each TESP zymogen is probably converted into a two-chain mature enzyme consisting of light and heavy chains covalently linked by a single pre-existing disulfide bond. The conversion may be accomplished by another protease(s) with a trypsin-like cleavage specificity, since it is unlikely that the mature TESP1 and TESP2 are capable of splitting the Lys-Ile bond between the light and heavy chains. Northern blot analysis of total cellular RNA demonstrates that the TESP1 and TESP2 genes are expressed only in the testis, and the transcripts are abundantly present in the haploid round spermatids. Moreover, immunocytochemical analysis of mouse cauda epididymal sperm using affinity-purified antibodies reveals that these two TESP are both localized in the sperm acrosome and are released during the acrosome reaction induced by calcium ionophore A23187. These findings provide additional clues

for elucidating the mechanisms involved in the sperm/egg interactions, including penetration of the zona pellucida by sperm. © 1998 Academic Press

To accomplish mammalian fertilization *in vivo*, it is necessary for sperm to enter and penetrate the zona pellucida (ZP), an extracellular matrix of the egg. Two possible mechanisms, a mechanical force mechanism and an enzymatic hydrolysis mechanism, have been proposed for the sperm entry and penetration through ZP (1). In the former mechanism, sperm motility is proposed to be sufficient to enable a sperm to push its way through the ZP. In the latter, acrosomal proteolytic enzymes are required for the limited hydrolysis of ZP and creation of a penetration pathway for the motile sperm. Since various trypsin inhibitors markedly block the sperm binding to and penetration of ZP *in vitro* (2-4), it appears reasonable to consider that the acrosomal enzymes with trypsin-like cleavage specificity play an important role(s) in the sperm/egg interaction at the early stages of fertilization.

We have previously produced male mice homozygous for a targeted, disruptive mutation in the mouse acrosin (*Acr*) gene, and have shown that the homozygous (*Acr*<sup>-/-</sup>) male mice are still fertile in spite of the absence of the acrosin protease activity in the sperm (5). Therefore, although this enzyme had long been believed to serve the limited hydrolysis of the ZP glycoproteins, our study (5) demonstrated conclusively that sperm do not require acrosin to penetrate the ZP. Further experiments of the *Acr*<sup>-/-</sup> mouse sperm have revealed that the major role of acrosin may be to accelerate the dispersal of acrosomal components during the acrosome reaction of sperm (K. Yamagata, *et al.*, submitted). Thus, protease(s) other than acrosin may be essential for the sperm penetration of ZP, and are most likely present in the sperm acrosome, since the *Acr*<sup>-/-</sup> mouse sperm are still capable of penetrating ZP (5, 6).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8572, Japan. Fax: +81-298-53-6632. E-mail: acroman@sakura.cc.tsukuba.ac.jp.

The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in the DDBJ, EMBL, and GenBank nucleotide sequence databases under Accession Nos. AB008910 (mouse TESP1) and AB008911 (mouse TESP2).

Abbreviations used: bp, base pair(s); GPI, glycosyl phosphatidylinositol; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; ZP, zona pellucida.



With this background, the goal of this study was to identify novel serine protease(s) involved in the sperm penetration of ZP. The cDNA clones encoding TESP1 or TESP2 (testicular serine proteases 1 or 2) have been isolated from a mouse testis cDNA library. The deduced amino acid sequences demonstrate that these two TESP s are structurally similar to each other. Moreover, these genes are specifically expressed in male germ cells, and the proteins synthesized are localized in the sperm acrosome. Possible structure/function relationships of TESP1 and TESP2 are discussed.

## MATERIALS AND METHODS

**Polymerase chain reaction (PCR).** A cDNA library was prepared from poly(A)<sup>+</sup> RNA of *Acr*<sup>-/-</sup> mouse testis, using a cDNA synthesis kit (Pharmacia LKB Biotechnology), according to the manufacturer's protocol. PCR was carried out using the testis cDNA library as a template. The following oligonucleotides were used as primers: SPP1, 5'-TGGGTTC(G)T(A/C/G)(A/T)CIGCIGCICA(C/T)TG-3' (sense); SPP2, 5'-GGICICCI(C/G)(A/T)(A/G)TCICCC(C/T)TG(A/G)CA-3' (antisense). The reaction was performed in a 50- $\mu$ l mixture containing 10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 0.01 mM each of the primers, approximately 30 ng of the template DNA, and 5 units of Taq DNA polymerase (Wako, Osaka, Japan). The reaction program consisted of 40 cycles of 93°C for 30 sec, 40°C for 120 sec, and 72°C for 30 sec. The PCR products were purified by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and then introduced into a pT7Blue T vector (Novagen) for sequence analysis.

**Isolation of cDNA clones.** Approximately  $4.5 \times 10^6$  recombinant plaques from a ddY mouse testis cDNA library in  $\lambda$ gt11 (7) were screened by the plaque hybridization method (8), using a PCR-amplified DNA fragment encoding TESP1 as a probe. The probe was labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Bresatec, Adelaide, Australia) by the random-priming procedure (9). Briefly, plaque lifts were prehybridized at 42°C in 5  $\times$  SSPE (1  $\times$  SSPE = 10 mM sodium phosphate, pH 7.7, 0.18 M NaCl, and 1 mM EDTA), 0.02% Ficoll 400, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% BSA, and 0.1% SDS. Hybridization was carried out at 60°C overnight in the prehybridization buffer containing denatured salmon testis DNA (0.1 mg/ml) and <sup>32</sup>P-labeled probe. The membranes were then washed in 2  $\times$  SSC (1  $\times$  SSC = 15 mM sodium citrate, pH 7.0, and 0.15 M NaCl) at room temperature for 10 min, in 2  $\times$  SSC containing 0.1% SDS at 60°C for 10 min, and in 2  $\times$  SSC at room temperature for 10 min before autoradiography at -80°C. Positive clones were plaque-purified, and the cDNA inserts were introduced into the *Eco*RI site of pUC19 for further characterization.

**Northern blot analysis.** Total cellular RNA (usually 10  $\mu$ g) was glyoxylated, separated on 1.2% agarose gels, and blotted onto Hybond-N<sup>+</sup> nylon membranes (Amersham). The blots were probed by <sup>32</sup>P-labeled DNA fragments. Stringency used for hybridization and washing was the same as that described by the manufacturer's protocol. After washing, the blots were autoradiographed at -80°C or analyzed by a BAS2000 Bio-Image Analyzer (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan).

**Preparation of antibodies.** A 17-residue oligopeptide, Thr-Ser-Asn-Thr-Ser-Leu-Lys-Pro-Arg-Gly-Arg-Val-Gln-Lys-Glu-Leu-Cys, at residues 43-59 in the TESP1 sequence (Fig. 1) was synthesized and coupled to maleimide-activated bovine serum albumin or ovalbumin (Pierce) according to the manufacturer's protocol. The PCR-amplified and 3'-end *Eco*RI/*Eco*RI DNA fragments encoding the C-terminal 334- and 159-residue sequences of TESP2 (Fig. 1) were introduced in frame into pET-23d (Novagen) and pGEMEX-1 (Promega), and expressed in *Escherichia coli* AD494 (DE3) and JM109 (DE3) to ob-

tain recombinant proteins, respectively. The 159-residue TESP2 sequence was expressed as a fusion protein with T7 gene 10 protein. Female rabbits were immunized using the 17-residue TESP1 peptide/bovine serum albumin conjugate or the TESP2/T7 gene 10 fusion protein as immunogens. Antisera raised against TESP1 and TESP2 were purified by fractionation with ammonium sulfate followed by affinity chromatography on columns of Sepharose 4B that had been substituted with the 17-residue TESP1 peptide/ovalbumin conjugate and the 334-residue recombinant TESP2 protein, respectively, by the cyanogen bromide procedure (10), as described previously (11).

**Immunocytochemical analysis of sperm.** Fresh cauda epididymal sperm were dispersed in a 0.2-ml drop of TYH medium (12) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air. The sperm were then capacitated by incubation at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air for 60 min. Capacitated sperm ( $4 \times 10^6$  sperm/ml) were induced to undergo the acrosome reaction by the addition of calcium ionophore A23187 to give a final concentration of 5  $\mu$ g/ml for 60 min under the conditions described above. Sperm suspensions treated with or without the ionophore were placed onto glass slides that had been coated with VECTABOND (Vector Laboratories, Burlingame, CA), treated with PBS containing 4% paraformaldehyde on ice for 30 min, and washed three times with PBS. Immunocytochemical staining was carried out by the avidin/biotin peroxidase complex method (13) using a Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories), according to the manufacturer's protocol. The sperm samples on the slides were stained using 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen, and viewed under an Olympus BX50 microscope.

**SDS-PAGE and Western blot analysis.** Proteins (almost 50  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE (14) and transferred onto Immobilon-P PVDF membranes (Millipore). After blocking with 1% skim milk, the blots were probed by affinity-purified antibody against TESP1 or TESP2, and then incubated with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories). The immunoreactive proteins were detected by an ECL Western blotting detection kit (Amersham).

## RESULTS

If sperm penetration of ZP requires a proteolytic activity to hydrolyze ZP after the acrosome reaction, a protease(s) other than acrosin must be present in the acrosome since *Acr*<sup>-/-</sup> mouse sperm are still capable of penetrating ZP (5, 6). To identify a novel serine protease(s), PCR was carried out using two oligonucleotides, SPP1 and SPP2, corresponding to the consensus sequences around the active-site residues, His and Ser, of trypsin-like proteases, as primers. A cDNA library prepared from poly(A)<sup>+</sup> RNA of *Acr*<sup>-/-</sup> mouse testis was used as the template. Of several DNA fragments obtained, only a fragment with an approximate size of 470 bp coded for a serine protease, as judged by the similarity of the amino acid sequence around the active-site residue, Asp. The DNA fragment was then used as a probe to screen a ddY mouse testis cDNA library, and cDNA clones encoding each of two similar but different serine proteases have been identified. We named these two proteases TESP1 and TESP2.

As shown in Fig. 1, the composite nucleotide sequences of the overlapping cDNA inserts coded for 367- and 366-residue preproteins of mouse TESP1 and TESP2 with calculated molecular masses of 40,765 and 40,252 Da, respectively. The N-terminal 31- and 29 (or 32)-residue sequences of the TESP1 and TESP2 prepro-



(A)

[illegible]

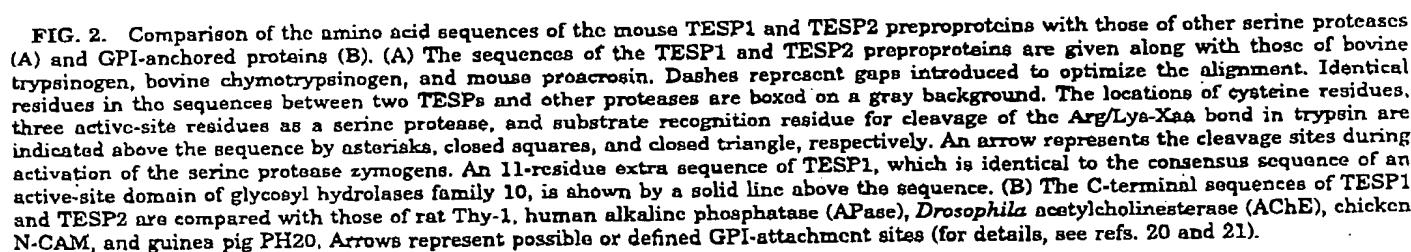
(B)

[illegible]

**FIG. 1.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA clones encoding mouse TESP1 (A) and TESP2 (B). The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence numbered in the 5'- to 3'-direction. The possible amino-terminal amino acids of the TESP zymogens are represented by closed arrows, while open arrows show an Ile-Tyr-Gly-Gly sequence indicative of the N-terminal sequence of an activated serine protease. Potential sites of the active-site residues as a serine protease, and the N-glycosylation at asparagine are indicated by closed triangles and asterisks, respectively. A putative polyadenylation signal, AATAAA, is underlined.







The sequence alignment of the two TESP s with three typical serine proteases, including mouse ac r sin, revealed several structural features (Fig. 2A). The amino acid residue preceding the Ile-Tyr-Gly-Gly sequence at the probable N-terminus of the activated enzyme was



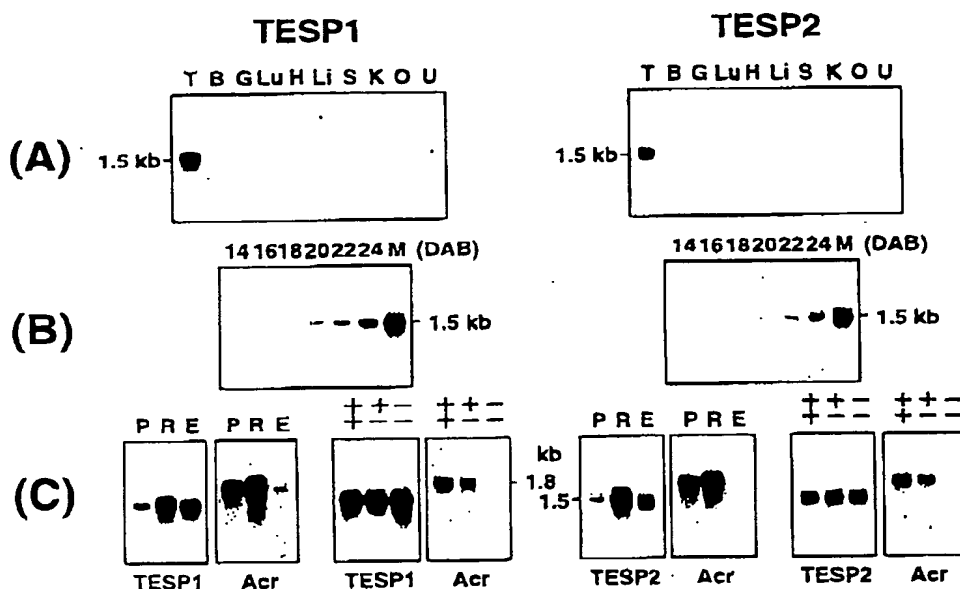


FIG. 3. Northern blot analysis of total cellular RNAs from various tissues and male germ cells using <sup>32</sup>P-labeled cDNA fragment encoding mouse TESP1 or TESP2. (A) A 1.5-kb mRNA signal for both TESP1 and TESP2 is present only in the testis (T) among the mouse tissues tested. B, brain; G, submaxillary gland; Lu, Lung; H, heart; L, liver; S, spleen; K, kidney; O, ovary; U, uterus. (B) The TESP1 and TESP2 genes are expressed at detectable level in the testis of mice at 20th day after birth (DAB), and abundantly in the sexually mature mouse testis (M, 60-70 DAB). (C) The expression levels of the two TESP genes are very low in purified populations of pachytene spermatocytes (P), and remarkably increase in the round spermatids (R). Noticeable amounts of the TESP1 and TESP2 mRNAs are still detectable in the elongating spermatids (E). These two TESP genes are equally expressed in the testes of wild-type (++), heterozygous (+-), and homozygous (--) mice for a targeted, disruptive mutation in the acrosin gene. The blots were first probed by a <sup>32</sup>P-labeled cDNA fragment encoding mouse acrosin (Acr), and then re-probed by the TESP1 or TESP2 cDNA fragment.

Lys at residue 67 in TESP1 (residue 70 in TESP2), as found in acrosin, trypsin, and chymotrypsin (Lys or Arg), implying that activation of the TESP zymogens requires a trypsin-like enzyme activity to split the Lys-Ile bond. The Asp residue, which acts as a recognition site for cleavage of the Arg/Lys-Xaa bond in trypsin (17), was replaced by Ser at residues 257 and 260 in TESP1 and TESP2, respectively, as is the case for chymotrypsin. Thus, the mature TESPs may be unable to split the Lys-Ile bond, in spite of the requirement of the trypsin-like enzyme for the zymogen activation.

TESP1 and TESP2 possessed an 8 to 10-residue extra sequence in the region between the active-site residues Asp and Ser (Fig. 2A). Interestingly, the 11-residue sequence of TESP1 at residues 231-241 was identical to the consensus sequence of an active-site domain of glycosyl hydrolases family 10 (18, 19), where Glu is the active-site residue. Moreover, the C-terminal sequences of TESP1 and TESP2 were approximately 50 residues longer than those of trypsin and chymotrypsin. Although these C-terminal sequences exhibited no significant similarity to those of known proteins deposited in the GenBank data base, the 30-residue sequence of TESP1 (29-residue sequence for TESP2) at the C-terminus appeared to be consistent with signal sequences of GPI-anchored proteins (20, 21), including

sperm hyaluronidase PH20 (Fig. 2B); the 3-residue sequences of Ser-Ala-Gly and Gly-Asn-Asn at residues 338-340 and 339-341 in TESP1 and TESP2, respectively, included a sequence with combinations of Ser, Ala, Gly, and Asn that is considered as a possible GPI-attachment site (20, 21). These two TESP genes also contained a stretch of a moderately hydrophobic sequence at almost 10 residues in the C-terminal region from the above 3-residue sequence. In some experiments, Western blot analysis of proteins released by treatment of sperm with *Bacillus cereus* PI-specific phospholipase C was performed to examine whether TESP1 and TESP2 are anchored in the acrosomal or plasma membranes by attachment to GPI (data not shown). However, we have failed to obtain a rigid data so far. Thus, additional experiments are necessary to prove that these two TESP genes are GPI-anchored proteins in the sperm membranes. At any rate, despite these structural differences described above, the location of Cys residues was well conserved between two TESP genes and other proteases.

When Northern blot analysis of total cellular RNA was carried out using *AccII/BglII* and *EcoRI/BamHI* cDNA fragments specific for TESP1 and TESP2 (nucleotides 669-782 and 639-733, respectively, see Fig. 1) as probes, a 1.5-kb mRNA signal for both TESP1 and



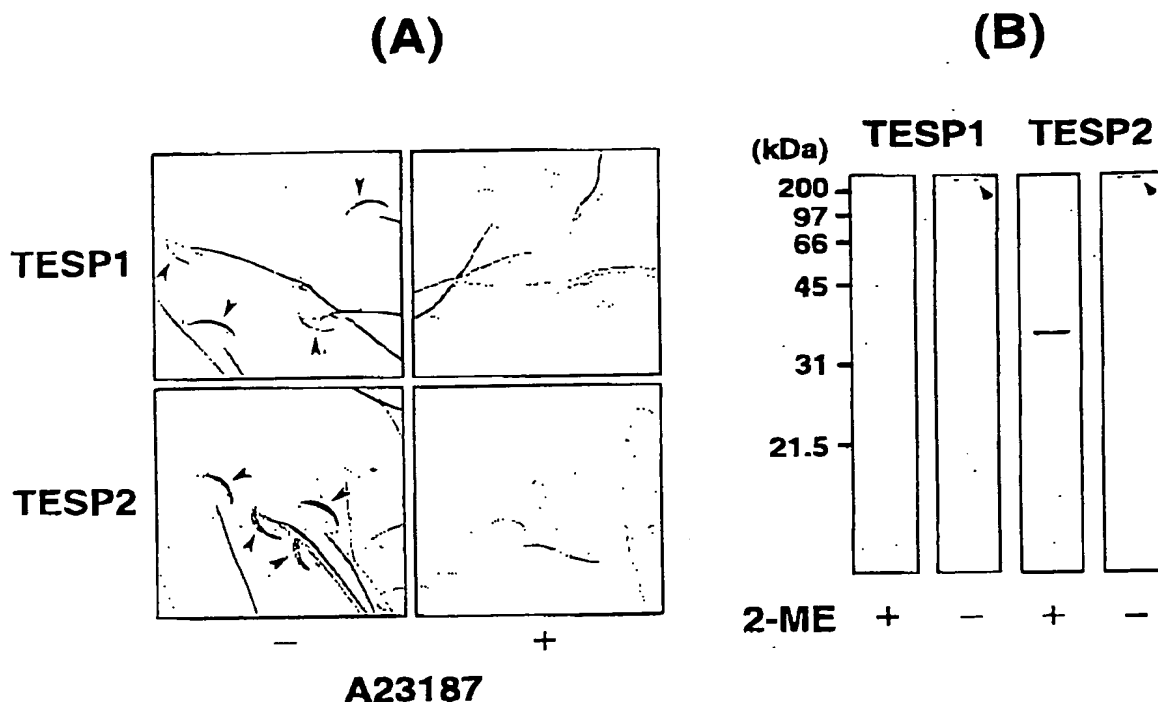


FIG. 4. Location of TESP1 and TESP2 in mouse cauda epididymal sperm. (A) Immunostaining of mouse epididymal sperm following calcium ionophore A23187 treatment. The capacitated sperm were incubated in TYH medium containing calcium ionophore A23187 at 37°C for 60 min. After fixation with 4% paraformaldehyde, the sperm were stained by the avidin/biotin peroxidase complex method (13) using affinity-purified anti-mouse TESP1 or TESP2 antibody. The staining signals are indicated by arrow heads. (B) Western blot analysis of proteins released from the acrosome during the acrosome reaction. The released proteins (approximately 50  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE under reducing (2-mercaptoethanol (2-ME), +) or non-reducing (2-ME, -) conditions, and then subjected to Western blot analysis using affinity-purified antibody against TESP1 or TESP2.

TESP2 was found only in the testis among the mouse tissues tested (Fig. 3A). The TESP mRNAs were detectable in the testis at 20th day after birth, and were abundantly present in the sexually mature mouse testis (Fig. 3B). In addition, the two TESP genes were expressed at detectable levels in purified populations of pachytene spermatocytes, and the expression levels remarkably increased in the round spermatids (Fig. 3C). Noticeable amounts of the TESP1 and TESP2 mRNAs were still detected in the elongating spermatids. These data demonstrate that the mouse TESP1 and TESP2 genes are expressed only in the testis, and most abundantly in the haploid round spermatids. It should be noted that the two TESP genes are equally expressed in the *Acr*<sup>+/+</sup>, *Acr*<sup>+/-</sup>, and *Acr*<sup>-/-</sup> mouse testes.

Immunocytochemical analysis of mouse cauda epididymal sperm was carried out using affinity-purified anti-mouse TESP1 and TESP2 antibodies (Fig. 4A). TESP1 and TESP2 were both localized in the sperm acrosome, and released during the acrosome reaction induced by calcium ionophore A23187. Western blot analysis of the released proteins during the acrosome reaction demonstrated the presence of 47- and 45-kDa proteins that immunoreacted with the anti-TESP1 an-

tibody under reducing conditions (Fig. 4B). When the reduced samples were probed by the anti-TESP2 antibody, the bands of three proteins with the sizes of 51, 42, and 37 kDa were detected. Of these three proteins, the 37-kDa protein reacted most predominantly. However, under non-reducing conditions, the two antibodies were only immunoreactive to proteins that barely migrated into the polyacrylamide gel with the exception of a 36-kDa protein that weakly immunoreacted with the anti-TESP2 antibody. Thus, TESP1 and TESP2 may be part of a large complex, either as oligomers or tight aggregates with other proteins, under non-reducing conditions.

## DISCUSSION

This study describes the existence of two novel serine proteases, TESP1 and TESP2, in the acrosome of mouse sperm. It has been already reported that sperm contain several proteolytic enzymes different from acrosin (22-24). However, none of these enzymes has yet been characterized well, and some of them are still identical to acrosin. Thus, this paper is the first report to show the presence of serine proteases other than



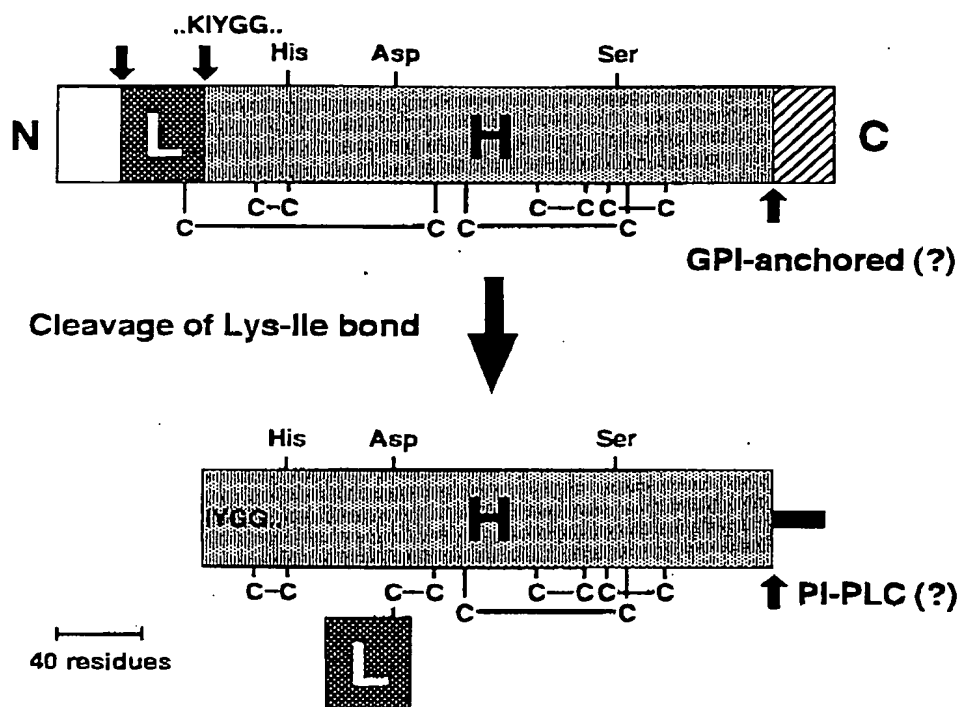


FIG. 5. Schematic representation of potential structure of mouse TESP2 preproprotein and possible mechanism of its maturation. The disulfide-bond arrangements (C-C) and positions for the active-site residues, His, Asp, and Ser, are based on the sequence similarity of TESP2 with other serine proteases. The TESP zymogen is probably processed into the mature enzyme to exhibit a proteolytic activity by cleavage of the Lys-Ile bond between light (L) and heavy (H) chains due to another trypsin-like enzyme(s). If TESP2 is GPI-anchored in the sperm membranes, this protein may be released from the membranes by the attack of PI-specific phospholipase C (PI-PLC). For details, see the text.

acrosin in the sperm acrosome. Moreover, TESP1 and TESP2 are unique since these two genes are transcribed only in the testis, so that both TESP1 and TESP2 are candidates for acrosomal proteins that play an important role(s) in the sperm/egg interaction, including the sperm penetration of ZP.

The deduced amino acid sequences indicate that TESP1 and TESP2 are initially synthesized as 367- and 366-residue preproproteins with putative 31- and 29 (or 32)-residue signal peptides at the N-termini, respectively (Fig. 1). The N-terminal sequences of 36 and 41 (or 38) residues in the pro-forms of TESP1 and TESP2, respectively, preceding the Ile-Tyr-Gly-Gly sequence indicative of the N-terminal sequence of an activated serine protease, likely correspond to activation peptides of some serine protease zymogens, including chymotrypsinogen (25) and proacrosin (26, 27). Indeed, the N-terminal sequences of TESP1 and TESP2 include a single Cys at residues 59 and 62, respectively, and there is a weak but significant sequence similarity around the Cys residue in the activation peptides among TESP1, TESP2 and other serine proteases (data not shown). Moreover, the conservation of the Cys residues between the entire sequences of these two TESP

and other serine proteases, particularly chymotrypsin, implies that Cys59 (TESP1) and Cys62 (TESP2) are disulfide-bonded to other residues at Cys178 (TESP1) and Cys181 (TESP2). The remaining eight Cys residues are predicted to form four intrachain disulfide bonds between residues 93 and 109, 192 and 269, 225 and 248, and 259 and 287 in TESP1 (between 96 and 112, 195 and 272, 228 and 251, and 262 and 290 in TESP2), suggesting that the pro-forms of TESP1 and TESP2 as well as chymotrypsinogen likely contain five intrachain disulfide bridges. Therefore, it may be concluded that the zymogens of mouse TESP1 and TESP2 are both single-chain polypeptides containing the regions of light and heavy chains, and are then converted into two-chain mature enzymes consisting of the two chains covalently linked by a single pre-existing disulfide bond (Fig. 5).

Each TESP zymogen must be processed into the mature enzyme to exhibit a proteolytic activity by cleavage of the Lys-Ile bond between light and heavy chains. However, TESP1 is most likely an inactive form of serine protease because of the replacement of Asp, one of three active-site residues, into Asn (Figs. 1 and 2). Also, it is unlikely that TESP1 and TESP2 are capable of





splitting the Arg/Lys-Xaa bond, since the substrate recognition residue, Asp, for this bond cleavage (17) is substituted by Ser in TESP1 and TESP2 as well as in chymotrypsin, as described above. These data may suggest that, even if the mature TESP1 is enzymatically active, each TESP zymogen is post-translationally converted into its mature form not by intramolecular autoactivation but by another trypsin-like enzyme(s).

We have attempted to prepare antisera that specifically recognize the regions containing the light chain sequences or the C-terminal sequences of the heavy chains in TESP1 and TESP2. However, only antibodies, which recognize the light-chain sequence of TESP1 or the C-terminal sequence of the TESP2 heavy chain, have been obtained. Immunocytochemical analysis using the affinity-purified antibodies demonstrates that TESP1 and TESP2 are localized in the sperm acrosome, and are released during the calcium ionophore-induced acrosome reaction (Fig. 4). As judged from the molecular sizes of the proteins immunoreactive to these antibodies, the 47- and 45-kDa proteins may correspond to TESP1 zymogen (51- and/or 42-kDa proteins for TESP2 zymogen), whereas the heavy chain of the mature TESP2 is probably recognized as the 37-kDa protein by the anti-TESP2 antibody. The absence of the immunoreactive protein band corresponding to the TESP1 heavy chain could result from the separation of the light and heavy chains of the mature TESP1 following reduction of the disulfide bonds prior to SDS-PAGE. If so, our data imply that the TESP1 and TESP2 zymogens may be activated by a processing enzyme(s) with a trypsin-like cleavage specificity during the acrosome reaction of sperm. It is therefore possible that the trypsin-like enzyme(s) act on some acrosomal proteins, including TESP1 and TESP2, during the acrosome reaction, leading to the acquisition and/or loss of the functions of the latent or active proteins.

To examine the enzymatic properties of TESP1 and TESP2, and to elucidate the roles of these two proteins *in vivo*, we aim to produce functional recombinant proteins and male mice lacking each of the TESP1 and TESP2 proteins by homologous recombination. These approaches will provide additional information concerning the roles of these two proteins in fertilization.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. George L. Gerton and Stanley Meizel for critical reading of the manuscript and helpful discussion, respectively. This study was partly supported by grants from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture in Japan and by TARA Sakabe/Shoun-project and NAIR "Molecular Mechanism and Design" project (T.B.).

## REFERENCES

1. Yanagimachi, R. (1994) in *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E., and Neill, J., Eds.), pp. 189-317, Raven Press, NY.
2. Zaneveld, L. J. D., Polakoski, K. L., Robertson, R. T., and Williams, W. L. (1975) in *Proteinase and Biological Control* (Fritz, H., and Tschesche, H., Eds.), pp. 236-242, de Gruyter, NY.
3. Wolf, D. P. (1977) *J. Exp. Zool.* 199, 149-156.
4. Saling, P. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6231-6235.
5. Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., and Toyoda, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 31845-31849.
6. Adham, I. M., Nayernia, K., and Engel, W. (1997) *Mol. Reprod. Dev.* 46, 370-376.
7. Kashiwabara, S., Baba, T., Takada, M., Watanabe, K., Yano, Y., and Arai, Y. (1990) *J. Biochem.* 108, 785-791.
8. Benton, W. D., and Davis, R. W. (1977) *Science* 196, 180-182.
9. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
10. Fuller, S. A., Takahashi, M., and Hurrell, J. G. R. (1991) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, P., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., Eds.), pp. 11.11.1-11.11.5, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY.
11. Baba, T., Niida, Y., Michikawa, Y., Kashiwabara, S., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Gerton, G. L., and Arai, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10133-10140.
12. Toyoda, Y., Yokoyama, M., and Hoshi, T. (1971) *Jap. J. Anim. Reprod.* 16, 147-151.
13. Hsu, S.-M., and Soban, E. (1982) *J. Histochem. Cytochem.* 30, 1079-1082.
14. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
15. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
16. Davis, E. M., Fujikawa, K., Kurachi, K., and Kisiel, W. (1979) *Adv. Enzymol.* 48, 277-318.
17. Young, C. L., Barker, W. C., Tomaselli, C. M., and Dayhoff, M. O. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Dayhoff, M. O., Ed.), Vol. 5, pp. 73-93, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD.
18. Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316.
19. Tull, D., Withers, S. G., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Warren, R. A. J., and Aebersold, R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15621-15625.
20. Forgunson, M. A., and Williams, A. F. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 285-320.
21. Cross, G. A. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 1-39.
22. Meizel, S., and Cotham, J. (1972) *J. Reprod. Fertil.* 28, 303-307.
23. McRorie, R. A., Turner, R. B., Bradford, M. M., and Williams, W. L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 492-498.
24. Eddy, E. M., and O'Brien, D. A. (1994) in *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E., and Neill, J., Eds.), pp. 29-77, Raven Press, NY.
25. Hartley, B. S., and Kauffman, D. L. (1966) *Biochem. J.* 101, 229-231.
26. Baba, T., Michikawa, Y., Kawakura, K., and Arai, Y. (1989) *FEBS Lett.* 244, 132-136.
27. Baba, T., Kashiwabara, S., Watanabe, K., Itoh, H., Michikawa, Y., Kimura, K., Takada, M., Fukamizu, A., and Arai, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11920-11927.



# Testisin, a New Human Serine Proteinase Expressed by Premetiotic Testicular Germ Cells and Lost in Testicular Germ Cell Tumors.<sup>1</sup>

John D. Hooper,<sup>1</sup> David L. Nicol,<sup>2</sup> Joanne L. Dickinson,<sup>2</sup> Helen J. Eyre,<sup>3</sup> Anthony L. Scarman,<sup>3</sup> John F. N. Smyle,<sup>3</sup> Melanie A. Stuttgen,<sup>4</sup> Meaghan L. Douglas,<sup>4</sup> Kate A. Lakoski Loveland,<sup>4</sup> Grant R. Sutherland,<sup>4</sup> and Toni M. Antal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Cellular Oncology Laboratory, University of Queensland Joint Oncology Program and Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland, 4029 [J. D. H., J. L. D., A. L. S., J. F. N., M. A. S., T. M. A.]; <sup>2</sup>Department of Urology, Princess Alexandra Hospital, Woolloongabba, Queensland, 4102 [D. L. N., M. L. D.]; <sup>3</sup>Centre for Medical Genetics, Department of Cytogenetics and Molecular Genetics, Women's and Children's Hospital, Adelaide, South Australia, 5006 [H. J. E., G. R. S.]; and <sup>4</sup>Institute for Reproduction and Development, Monash Medical Center, Monash University, Clayton, Victoria 3168 [K. A. L. L., Australia]

## ABSTRACT

We have cloned and characterized a cDNA encoding a new human serine proteinase, testisin, that is abundantly expressed only in the testis and is lost in testicular tumors. The testisin cDNA was identified by homology cloning using degenerate primers directed at conserved sequence motifs within the catalytic regions of serine proteinases. It is 1073 nucleotides long, including 942 nucleotides of open reading frame and a 113-nucleotide 3' untranslated sequence. Northern and dot blot analyses of RNA from a range of normal human tissues revealed a 1.4-kb mRNA species that was present only in testis, which was not detected in eight of eight testicular tumors. Testisin cDNA is predicted to encode a protein of 314 amino acids, which consists of a 19-amino acid (aa) signal peptide, a 22-aa proregion, and a 273-aa catalytic domain, including a unique 17-aa COOH-terminal hydrophobic extension that is predicted to function as a membrane anchor. The deduced amino acid sequence of testisin shows 44% identity to prostasin and contains features that are typical of serine proteinases with trypsin-like substrate specificity. Antipeptide antibodies directed against the testisin polypeptide detected an immunoreactive testisin protein of *M<sub>r</sub>* 35,000–39,000 in cell lysates from COS-7 cells that were transiently transfected with testisin cDNA. Immunostaining of normal testicular tissue showed that testisin was expressed in the cytoplasm and on the plasma membrane of premeiotic germ cells. No staining was detected in eight of eight germ cell-derived testicular tumors. In addition, the testisin gene was localized by fluorescence *in situ* hybridization to the short arm of human chromosome 16 (16p13.3), a region that has been associated with allelic imbalance and loss of heterozygosity in sporadic testicular tumors. These findings demonstrate a new cell surface serine proteinase, loss of which may have a direct or indirect role in the progression of testicular tumors of germ cell origin.

## INTRODUCTION

Spermatogenesis, the tightly regulated and dynamic process of male germ cell maturation, occurs in the testis within seminiferous tubules and results in the transformation of a mitotic spermatogonia into a haploid spermatozoan (1). Testicular germ cell tumors arise from immature male germ cells and may differentiate along pathways resulting in several different histological patterns (e.g., seminoma, teratoma, yolk sac tumor, and mixed germ cell tumor). Individual tumors exhibit one or more of these histological patterns. In contrast to many other malignancies, underlying genetic mechanisms in testicular tumorigenesis have not been substantially defined. Familial forms of testicular carcinoma are rare (2), but studies of sporadic

testicular tumors have demonstrated loss of heterozygosity on 5q, 11p15.5, 11q13.1, 13q3, and 16p13.3 (3), suggesting that these regions may contain candidate tumor suppressor genes.

Testicular germ cell maturation is dynamic, requiring cell-cell communication and localized cell-extracellular matrix interactions (4). Regulation of such processes involves cell surface proteolysis, which is important not only for matrix remodeling but also for regulation of growth and differentiation through activation and/or release of functionally diverse effector molecules, including cytokines, growth factors, and cell surface receptors. Not only is characterization of cell surface proteolysis important for understanding germ cell maturation, but cell surface proteinases also constitute potential new targets for anticancer therapies.

The serine proteinases are a large multigene family, the members of which participate in proteolytic reactions that are essential to a diverse range of physiological and pathological processes (5). These enzymes are generally expressed as inactive zymogens; activation results in rapid molecular responses without the requirement for *de novo* protein synthesis. The involvement of serine proteinases during the later stages of male germ cell maturation and in fertilization has been documented. The testis-specific serine proteinases human acrosin (6) and mouse TESP-1 and TESP-2 (7) are recognized as playing roles during the final stages of sperm development. Additionally, the prostate epithelial cell serine proteinase, PSA,<sup>4</sup> catalyzes the liquefaction of seminal coagulum (8). Plasminogen activators have been implicated in the degradation of tight junctions in the seminiferous tubules of rat testes (9). Furthermore, as yet uncharacterized serine proteinases are also present on sperm cells as they pass through the epididymis and are necessary for the segregation of sperm surface proteins into distinct domains and the attainment of fertilization competence (10, 11).

The enzymatic properties of serine proteinases are dependent on a catalytic triad of His, Asp, and Ser amino acids (12), which are present in motifs that are highly conserved among family members. We have exploited this property in the present study by using a "homology cloning" strategy (13–15) to identify a novel serine proteinase. Testisin is the first serine proteinase to be identified that is expressed by germ cells prior to the first meiotic division and likely functions in proteolytic reactions that are associated with male germ cell maturation. Its loss of expression by testicular tumors of germ cell origin and the localization of the testisin gene to chromosome 16 (16p13.3), a region of the genome that is subject to loss of heterozygosity and rearrangement in human testicular cancers, suggest a potential role for testisin as a tumor suppressor in testicular cancer.

## MATERIALS AND METHODS

**Homology Cloning of Testisin cDNA.** Homology cloning was performed by reverse transcription-PCR using degenerate oligonucleotides directed at

Received 2/18/99; accepted 4/29/99.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup>Supported by grants from the Queensland Cancer Fund, Brisbane, Australia, and AMRAD Operations Pty. Ltd, Melbourne, Australia. J. D. H. was supported by a John Earnshaw Scholarship from the Queensland Cancer Fund and by the Bancroft Scholarship, Queensland Institute of Medical Research, J. L. D. was supported in part by a Dora Lush Post-Graduate Biomedical Scholarship from the National Health and Medical Research Council of Australia.

<sup>2</sup>Present address: The Eye Clinic, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, 7000, Australia.

<sup>3</sup>To whom requests for reprints should be addressed, at Queensland Institute of Medical Research, Post Office Royal Brisbane Hospital, Brisbane, 4029, Queensland, Australia. Phone: 61 7 3362 0312; Fax: 61 7 3362 0107; E-mail: toniA@qimr.edu.au.

<sup>4</sup>The abbreviations used are: PSA, prostate-specific antigen; RACE, rapid amplification of cDNA ends; GST, glutathione S-transferase; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.



conserved regions of serine proteinases (13–15). Total RNA (5 µg), isolated from the human cervical adenocarcinoma cell line HeLa S3 (ATCC CCL 2.2) by the method described previously (16), was reverse transcribed at 42°C using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) in the presence of oligo(dT)<sub>12–18</sub> (0.25 µg/µl; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, and 0.5 mM spermidine in a total volume of 20 µl. PCR was performed using 1 µl of the reverse transcriptase reaction mixture, 500 ng of each primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, and 1–2 units of Taq polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The primers were: forward, 5'-ACAGAATTCTGGGTGTGTACIGCIGCICAYTG-3'; and reverse, 5'-ACAGAATTCAIXGGICICIC(C/G)(T/A)XTCIC-3' (X = A or G, Y = C or T; I = inosine). Cycling conditions were as follows: 2 cycles of 94°C for 2.5 min, 35°C for 2.5 min, and 72°C for 3 min; followed by 33 cycles of 94°C for 2.5 min, 57°C for 2.5 min, and 72°C for 3 min; and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products of ~450 bp were ligated into pGEM-T (Promega), cloned, and analyzed by DNA sequencing. A DNA fragment was identified that represented a partial testisin cDNA (nucleotides 267–723). The 3' end of full-length testisin cDNA (Clone U, encoding nucleotides 347–1073) was obtained by screening a human HeLa cell Uni-ZAP XR cDNA library (Stratagene, La Jolla, CA) with the radiolabeled partial testisin cDNA fragment obtained by reverse transcription-PCR. Clones encoding the 3' end of full-length testisin cDNA were obtained both by 5' RACE and screening of the HeLa cell library by PCR. 5' RACE (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) was performed using the nested primers 5'-TCTGTCCGGTTC-CAAA-3' and 5'-CGAAGTAACGGGTGTAGTAG-3' and the supplied anchor primer. The longest clone obtained, R1-2, spanned nucleotides 34–379 of the full-length cDNA. PCR screening of the HeLa cell library was performed using two rounds of amplification with the same nested gene-specific primers and a vector-specific oligonucleotide (T<sub>3</sub>, 5'-ATTAACCTCACTA-AAGGGA-3'). Step-down cycling conditions were: 95°C for 10 min; 3 cycles at each annealing temperature of 95°C for 30 s, 70–62°C in 2°C steps for 30 s, and 72°C for 3 min; followed by 18 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 3 min; and a final extension at 72°C for 7 min. The longest clone obtained, 5-4, encoded nucleotides 1–527 of the full-length cDNA.

**Plasmid Construction.** A plasmid containing full-length testisin [testisin(L)] cDNA was generated by ligating a *Bgl*I-*Xba*I DNA fragment from clone 5-4 into *Bgl*I-*Xba*I-digested clone U, generating pBluescriptHELA2(L)B65. A *Kas*I-*Msc*I DNA fragment from clone R1-2 was ligated into the *Kas*I-*Msc*I-digested pBluescriptHELA2(L)B65 to generate pBluescriptHELA2(S)B41, the construct encoding the short isoform, testisin(S).

A *Sau*3AI fragment of pBluescriptHELA2(S)B41 encoding amino acids 90–279 was cloned into the *Bam*HI site of pGEX-1 (Pharmacia Biotech) to generate a partial GST-testisin fusion construct for expression in *Escherichia coli*.

For expression in eukaryotic cells, a DNA fragment encoding nucleotides 13–954 of the testisin(S) isoform from pBluescriptHELA2(S)B41 was generated by PCR using the following primers: forward, 5'-GCACAGGTACC-GAGGCCATGGCGCGCGC-3'; and reverse, 5'-GCACATCTAGATCAG-TGGTGGTGGTGGTGGTGGACCGGCCCCAGGAGTGG-3'. The amplification product was cloned into pGEM-T (Promega). The fragment was then excised with *Nor*I and cloned into the *Nor*I site of pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA), generating pcDNA3Test(S-C). An expression vector containing the long isoform, pcDNA3Test(L-C) encoding nucleotides 13–960 of the testisin(L) was generated using the same procedure from pBluescriptHELA2(L)B65.

All constructs were verified by DNA sequence analysis.

**Patients and Tumor Specimens.** Eight paired samples of testicular tumors and adjacent unaffected testicular tissue were obtained at the time of surgery and were snap-frozen in liquid nitrogen for RNA analyses. In addition, portions of unaffected testis, tumor tissues, and junctional specimens (at the tumor and unaffected testis tissue interface) were processed for routine histological examination by paraffin-embedding formalin-fixed tissue. Histological evaluation was based on routine pathology reports and included four seminomas, one teratoma, one yolk sac tumor, and two mixed germ cell tumors. Normal testicular tissue was also obtained from a patient undergoing bilateral orchidectomy for treatment of prostatic carcinoma.

**Northern and Poly(A)<sup>+</sup> RNA Dot Blot Analyses.** Total RNA isolated from frozen tissue specimens and the cell lines HeLa S3 and SW480 (ATCC CCL 228), was separated by denaturing gel electrophoresis and transferred to

Hybond-N nylon membranes (Amersham, Aylesbury, United Kingdom) as described (16). Human multiple-tissue Northern blots and a human multiple-tissue dot blot (Clontech, Palo Alto, CA) were obtained commercially. The multiple-tissue Northern blot contained 2 µg of poly(A)<sup>+</sup> RNA per lane. The dot blot contained poly(A)<sup>+</sup> RNA from 50 normal adult and fetal tissues normalized to the mRNA expression levels of eight different housekeeping genes and ranged from 89 to 514 ng. Blots were hybridized with [<sup>32</sup>P]dCTP-labeled *Msc*I-*Bam*HI testisin(L) fragment (nucleotides 321–861) in ExpressHyb (Clontech) solution at 65°C and washed to a final stringency of 0.2× SSC-0.1% SDS at 65°C. The dot blot was washed to a final stringency of 0.1× SSC-0.5% SDS at 60°C. Blots were reprobbed with β-actin cDNA or an oligonucleotide probe for 18S rRNA (16) to confirm RNA loading in each lane.

**Production of Affinity-purified Antipeptide Polyclonal Antibodies.** Rabbit polyclonal antibodies were generated against testisin-specific peptides derived from nonhomologous hydrophilic regions within the catalytic domain of testisin. Two peptides, each containing a cysteine residue incorporated at the COOH terminus, were synthesized (Auspep, Parkville, Australia) and conjugated to keyhole limpet hemocyanin using μ-maleimidobenzoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester. The peptide sequences were as follows: T175-190, Gly-Tyr-Ile-Lys-Glu-Asp-Glu-Ala-Leu-Pro-His-Thr-Leu-Gln-Cys; and T46-63, Glu-Asp-Ala-Glu-Leu-Gly-Arg-Trp-Pro-Trp-Gln-Gly-Ser-Leu-Arg-Leu-Trp-Asp-Cys (short isoform numbering). Rabbit antisera were peptide affinity-purified using SulfoLink coupling gel (Pierce, Rockville, IL). The specificity of each antibody was tested against the immunogenic peptide by ELISA and against recombinant testisin by Western blot.

**Western Blot Analysis.** Proteins were separated by SDS-PAGE on 10–12% gels and transferred electrophoretically to Hybond-P membranes (Amersham). Membranes were blocked with 5% nonfat skim milk powder in Tris-buffered saline [10 mM Tris-HCl (pH 7.0)-150 mM NaCl], incubated with affinity-purified antipeptide antibody and then with horseradish peroxidase-conjugated sheep antirabbit immunoglobulin secondary antibody, and visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham).

**Immunohistochemistry.** Paraffin sections (5 µm) of Bouin's-fixed normal human testis tissue or formalin-fixed tissues from testicular cancer patients were deparaffinized and then rehydrated before antigen retrieval in boiling 10 mM citric acid buffer (pH 6). After cooling, endogenous peroxidase activity was inhibited by a 10-min incubation in 1% hydrogen peroxide. Nonspecific antibody binding was blocked by incubating the sections in 4% nonfat skim milk powder in Tris-buffered saline for 15 min, followed by 10% normal goat serum for 20 min. Affinity-purified antitestisin T175-190 antibody was applied at 1:200 dilution and incubated overnight in a humidified chamber at room temperature. Controls included sections incubated with no primary antibody or antibody that had been preabsorbed for 2 h at room temperature with 1 µg of the antigenic peptide. Following incubation with prediluted biotinylated goat antirabbit immunoglobulins (Zymed, San Francisco, CA), streptavidin-horseradish peroxidase (Zymed) was applied, and color was developed using the chromogen 3,3'-diaminobenzidine with hydrogen peroxide as substrate. The sections were counterstained in Mayer's hematoxylin.

**FISH.** Plasmid DNA encoding full-length testisin cDNA was labeled with biotin-14-dATP by nick translation and hybridized *in situ* at a final concentration of 20 ng/ml to human metaphase chromosomes from two normal males. The method was modified from that described previously (17), in that chromosomes were stained before analysis with both propidium iodide (as counterstain) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (for chromosome identification). Images of metaphase preparations were captured by a cooled charged coupled device camera using the Cyto Vision Ultra image collection and enhancement system (Applied Imaging Int., Ltd., Newcastle, United Kingdom).

## RESULTS

**Isolation of Human Testisin cDNA by Homology Cloning.** PCR amplification of cDNA was performed with degenerate primers designed to anneal to cDNA encoding the conserved regions surrounding the catalytic histidine and serine amino acids of serine proteinases. The deduced amino acid sequence of one amplified product showed high homology to the family of serine proteinases. Extended cDNA sequence of this clone was obtained by library screening and 5'



RACE. The final nucleotide sequence<sup>5</sup> revealed that testisin cDNA was 1073 nucleotides long and included an 18-nucleotide 5' untranslated region, an open reading frame of 942 nucleotides, and a 113-nucleotide 3' untranslated region with a polyadenylation signal 34 nucleotides upstream from the poly(A) sequence (Fig. 1). The nucleotide sequence surrounding the proposed start codon showed good agreement with the Kozak consensus for eukaryotic translation initiation (18). The deduced amino acid sequence of the open reading frame predicted a polypeptide of 314 amino acids, including pre-, pro-, and catalytic regions, with a  $M_r$  of 34,800 and possessing three potential *N*-glycosylation sites at Asn<sup>167</sup>, Asn<sup>200</sup>, and Asn<sup>273</sup> (Fig. 1). *In vitro* transcription/translation of testisin cDNA generated a protein product of  $M_r$  ~35,000 (data not shown), demonstrating that the predicted start codon was functional *in vitro*. A hydropathy plot (19) of the amino acid sequence revealed a hydrophobic region located at amino acid positions 1–19 that conformed with the consensus for a typical NH<sub>2</sub>-terminal secretory signal peptide (20). Thus, this region is likely to function as a signal peptide, directing the newly synthesized protein to enter the endoplasmic reticulum. Unusually for members of the serine proteinase family, a second hydrophobic region was identified at the COOH terminus of testisin at amino acids 298–314. This COOH-terminal extension likely constitutes a membrane anchor, as has been reported for the serine proteinases prostatic (21) and CAP1 (22).

Comparison of the predicted testisin polypeptide with protein databases showed that it possessed the hallmark features of the serine proteinase family. It is a putative zymogen containing pro- and catalytic regions of 22 and 273 residues, respectively (Fig. 1), delineated by a classic serine proteinase activation motif Arg<sup>41</sup>-Ile-Val-Gly-Gly, with cleavage likely occurring between Arg<sup>41</sup> and Ile<sup>42</sup>. The catalytic region includes the triad of His<sup>82</sup>, Asp<sup>137</sup>, and Ser<sup>238</sup> residues in positions and surrounding motifs that are required for catalytic activity of serine proteinases. Ten Cys residues occur in conserved positions. By analogy to other serine proteinases, eight of these are likely to function to form disulfide bridges within the catalytic region, and the remaining two are likely to link the pro- and catalytic regions (Fig. 1).

cDNAs encoding two testisin isoforms, designated testisin(S) and testisin(L), were identified. These two isoforms differed by six nucleotides, CTATAG, at nucleotide position 276 (Fig. 1). This six-nucleotide insertion incorporates a consensus 3' splice site, and the position of this insertion within the cDNA sequence is consistent with the position of an intron-exon junction in other serine proteinase genes of the chymotrypsin family (23–25), suggesting that these isoforms may have arisen as a result of alternative mRNA splicing. The presence of these six nucleotides results in the insertion of two amino acids Tyr<sup>87</sup>-Ser in the polypeptide sequence, only four amino acids distant from the catalytic His<sup>82</sup>. The functional significance of this insertion to the catalytic activity and/or substrate specificity of testisin is not yet known.

**Testisin mRNA Is Strongly Expressed Only in Testis.** Northern blot analysis showed that testisin mRNA of ~1.4 kb was expressed constitutively in HeLa cells, whereas no expression was detected in the colon cancer cell line SW480 (Fig. 2A). The distribution of testisin mRNA in a range of normal human tissues was examined by Northern blot. Analysis of poly(A)<sup>+</sup> RNA from 16 normal human tissues showed a single transcript of ~1.4 kb detected only in human testis (Fig. 2B). To extend this analysis, we hybridized a commercially available dot blot containing poly(A)<sup>+</sup> RNA from 50 normal human tissues with the testisin cDNA probe. Abundant expression of testisin

mRNA was detected only in the testis (Fig. 2C), with prolonged exposures showing barely detectable signals in salivary gland, bone marrow, lung, and trachea.

**Homology of Testisin with Other Serine Proteinases.** The predicted amino acid sequence of testisin shares 44% identity to human prostatic (21), 39% to *Xenopus* CAP1 (22), 38% to human hepsin (26), 36% to human acrosin (27), 30% to human chymotrypsin (28), and 26% to PSA (8). Alignment of testisin with the sequences of several serine proteinases reveals a number of common features (Fig. 3). The catalytic triad of His<sup>82</sup>, Asp<sup>137</sup>, and Ser<sup>238</sup> and their surrounding motifs are in positions that are highly conserved among other serine proteinases. The presence of Asp<sup>232</sup> at the bottom of the serine proteinase binding pocket six residues before the active site (Ser<sup>238</sup>) predicts that testisin has trypsin-like specificity with proteolytic cleavage after Arg or Lys residues in target substrates. A conserved Ser<sup>257</sup>-Trp-Gly motif is predicted to be located at the top of the binding pocket in testisin and is likely to be involved in correct orientation of the scissile bond of the substrate.

**Expression of Recombinant Testisin in Bacteria and Eukaryotic Cells.** Recombinant testisin was expressed in *E. coli* as a GST-testisin<sup>90–279</sup> fusion protein. Fig. 4A shows a Western blot of the GST-testisin<sup>90–279</sup> fusion protein following induction and purification from *E. coli*. The fusion protein was immunoreactive against affinity-purified antibodies generated against the testisin-specific peptide (T175–190).

Transient expression of testisin from cDNA under the control of the constitutive cytomegalovirus promoter was demonstrated in COS-7 cells. Maximal testisin protein expression was observed 36 h after

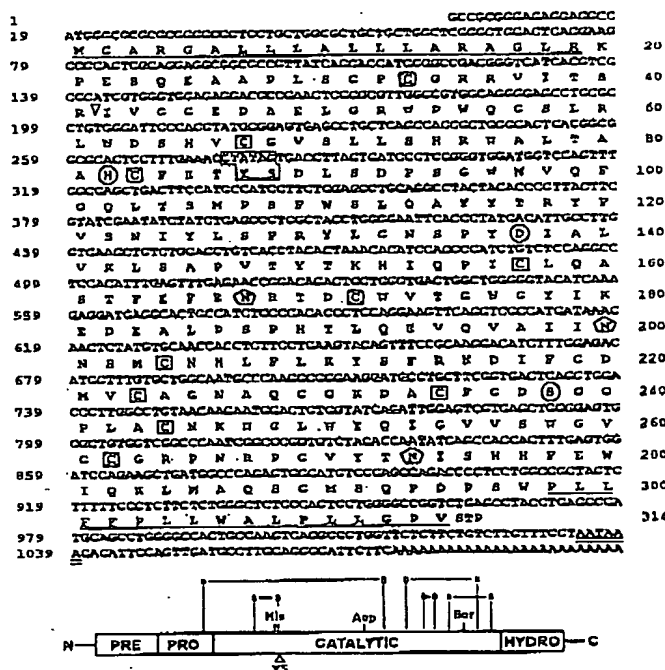


Fig. 1. Nucleotide sequence of testisin cDNA and its deduced amino acid sequence. Nucleotides are numbered on the left, and amino acids are numbered on the right. Predicted catalytic His, Asp, and Ser residues are circled. The Cys residues predicted to form disulfide bonds are boxed. The CTATAG nucleotide sequence and the encoded amino acids present in the testisin(L) isoform are boxed. The predicted zymogen activation site (V) and potential *N*-glycosylation sites (N) are indicated. The putative NH<sub>2</sub>-terminal signal sequence and COOH-terminal hydrophobic extension are underlined. The polyadenylation signal is double underlined. Below the sequence is a schematic representation of predicted testisin domains including pre-, pro-, catalytic, and hydrophobic COOH-terminal domains.

<sup>5</sup> The nucleotide sequence reported in this paper has been deposited in the DDBJ/GenBank/EMBL database (accession no. AF058300; deposited April 8, 1998).





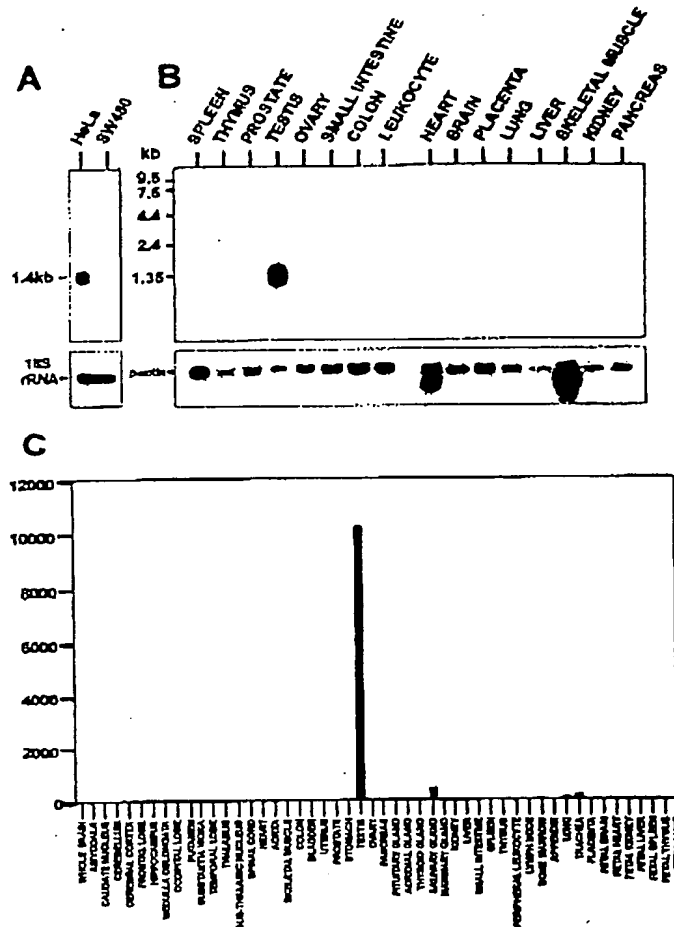


Fig. 2. Testisin mRNA expression. A, Northern analysis of total RNA isolated from HeLa and SW480 cells, probed with  $^{32}\text{P}$ -labeled testisin or labeled 18S rRNA as a loading control. B, Northern blot analysis of mRNA blots probed with  $^{32}\text{P}$ -labeled testisin cDNA or labeled  $\beta$ -actin cDNA. C, graphical representation of signal intensities obtained following hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labeled testisin cDNA of a commercial poly(A)+ RNA dot blot containing 50 normal human tissues. The units on the Y axis are arbitrary.

transient transfection, with an immunoreactive band detected at  $M_r$  ~35,000–39,000 (Fig. 4B). Because the mature testisin zymogen would be predicted to migrate at  $M_r$  32,700, these data indicate that testisin undergoes a posttranslational processing event, such as N-glycosylation. Testisin was undetectable in conditioned media from these cells, demonstrating that testisin was predominantly cell-associated (data not shown).

**Testisin Is Associated with Primary Spermatocytes during the First Meiotic Prophase.** Maturation of male germ cells proceeds through several ordered stages, with maturation occurring from the base of the seminiferous tubules toward the tubule lumen. Committed spermatogonia undergo two rounds of meiotic division, passing in the first meiotic prophase, sequentially through preleptotene, leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene stages, during which chromosome pairing and cross-over events occur. Following the first meiotic division, the resultant secondary spermatocytes proceed through a second meiotic division to become haploid round spermatids, which are further processed through a continuum of gross morphological changes to elongated sperm (1). To begin to understand the function of testisin in human testis, we examined testisin protein expression by immunohistochemical analysis of normal human adult testis. Testisin expression was first seen in zygotene spermatocytes and staining

progressively increased with stage, with the most intense immune-specific staining seen in late pachytene and diplotene spermatocytes (Fig. 5A). Staining was diffuse within the cytoplasm of these cells with a corresponding accentuation of the plasma membrane, consistent with the identified COOH-terminal extension being involved in anchoring of testisin on the cell surface. In addition there was intense, focal, cell surface staining at some spermatocyte junctions (Fig. 5C). Some spermatocytes also showed evidence of dense, crescent-shaped

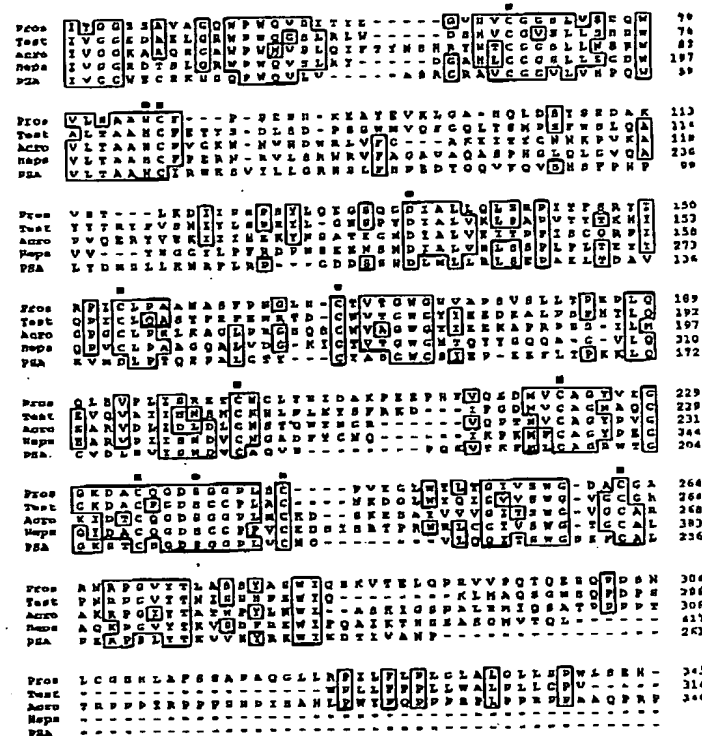


Fig. 3. Alignment of testisin with closely related serine proteinases. Residues which are identical between at least three of the serine proteinases are boxed; ■, disulfide bond-forming cysteines; ●, catalytic residues. Dashes represent gaps for alignment purposes. The COOH-terminal extension of acrosin has been truncated in this figure. GenBank database accession nos. are as follows: procathepsin, U33446; acrosin, Y00970; hepsin, X07732; PSA, X05332.

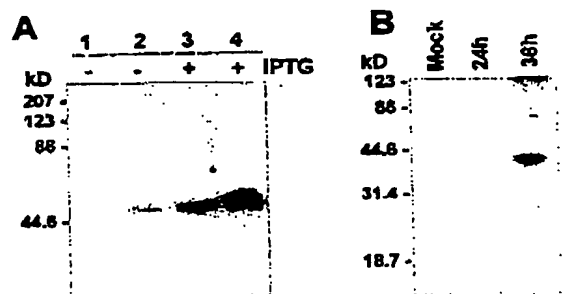


Fig. 4. Expression of recombinant testisin. A, Western blot of expression in *E. coli* of the recombinant GST-testisin<sup>90-279</sup> fusion protein. Lane 1, untransformed *E. coli* DH5a cells; Lane 2, *E. coli* DH5a cells transformed with GST-testisin<sup>90-279</sup> expression construct (uninduced); Lane 3, *E. coli* DH5a cells transformed with GST-testisin<sup>90-279</sup> expression construct (induced with 0.5 mM isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside for 3 h); Lane 4, GST-testisin<sup>90-279</sup> fusion protein affinity-purified on Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). B, Western blot of transiently transfected testisin in COS-7 cells. Approximately  $5 \times 10^6$  COS-7 cells were transfected with pcDNA3Test(S-C) by electroporation and harvested after the times indicated. Mock-transfected cells were transfected with vector alone for 24 h. Both blots were probed with antitestisin(T175-190) polyclonal antibody.



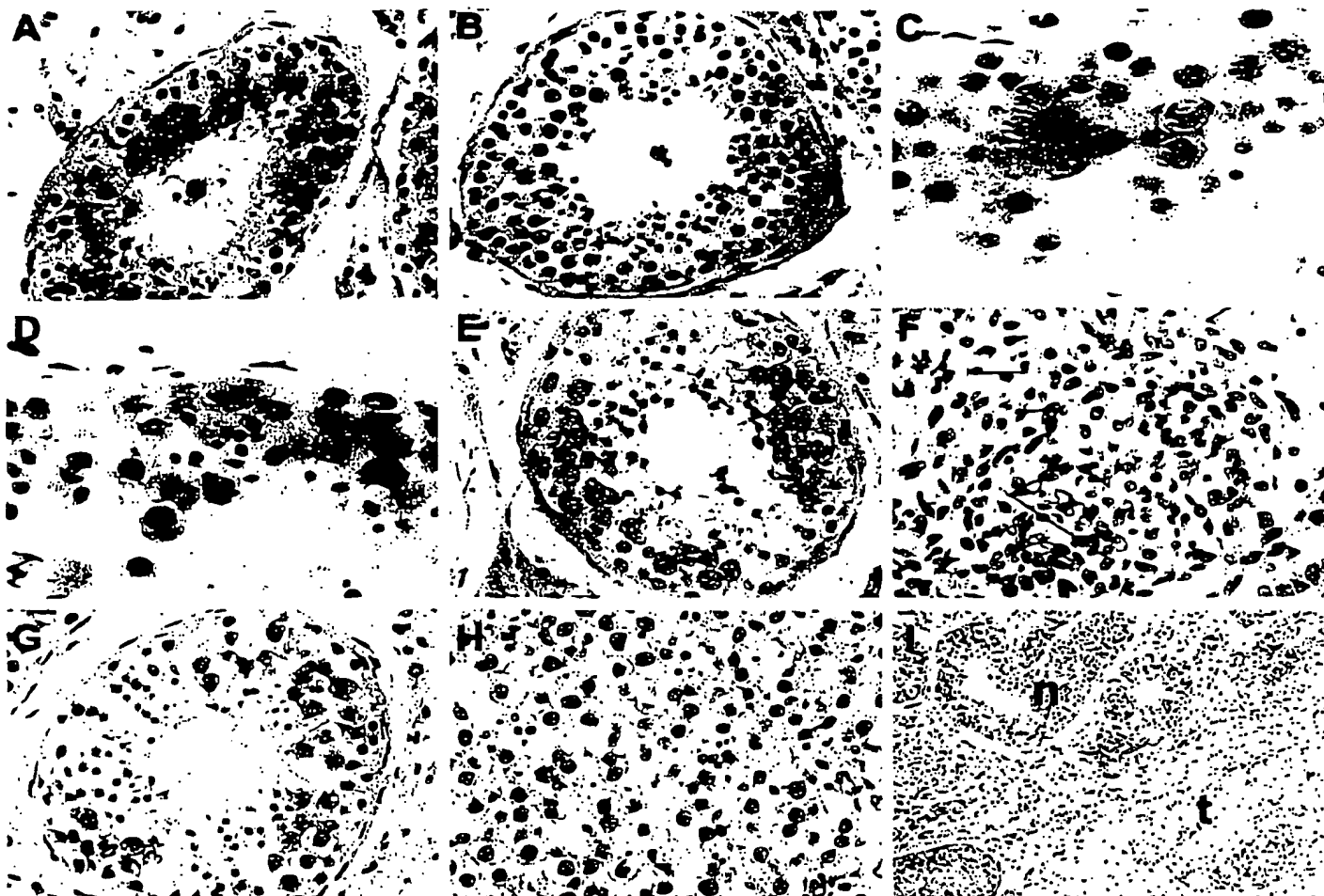


Fig. 5. Analysis of testisin expression in normal adult testis and in testicular tumors. Immunohistochemical staining of testicular tissues was performed using the affinity-purified antitestisin peptide (T175-190) polyclonal antibody as primary antibody. *A*, a representative seminiferous tubule showing intense staining in the cytoplasm and plasma membrane of pachytene spermatocytes. *B*, as in *A*, except the primary antibody was preadsorbed with the immunogenic peptide for 2 h. *C* and *D*, near views showing accentuation of membrane staining on pachytene spermatocytes and evidence of compartmentalized staining. *E*, testisin staining in an unaffected tubule from patient 795; *F*, staining of a section of a teratoma from patient 798; *G*, testisin staining in an unaffected tubule from patient 798; *H*, staining of a section of a seminoma from patient 798; *I*, far-field view of an unaffected/tumor junctional tissue section from patient 798. Regions of unaffected (*n*) and tumor (*t*) tissue are indicated. Magnifications,  $\times 400$  (*A-H*) and  $\times 100$  (*I*).

compartmentalized staining as shown in Fig. 5*D*. No detectable staining was seen in spermatogonia, spermatids, Sertoli cells, or other cells of the testicular interstitium. Control experiments using the T175-190 polyclonal antibody in the presence of competing T175-190 peptide showed absence of this specific staining pattern (Fig. 5*B*). An identical, albeit weaker, staining pattern was observed in experiments performed using a testisin-specific antibody generated against a testisin peptide, T46-63 (data not shown).

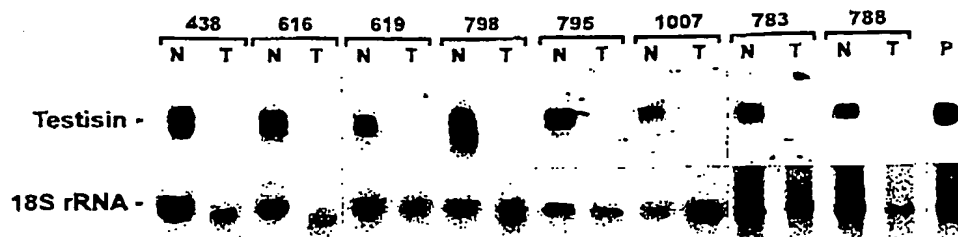
**Testisin Expression Is Lost in Testicular Tumors.** Because the vast majority of testicular cancers arise from male germ cells and because premeiotic germ cells have been hypothesized to be precursors for male germ cell tumors (29, 30), testisin expression was examined in a series of these cancers. Northern blot analysis of RNA isolated from eight paired specimens of testicular tumor and unaffected testis showed strong signals for testisin mRNA in all unaffected samples; no signal was detected in any corresponding testicular tumors (Fig. 6). Immunohistochemical staining for testisin protein expression in each of these patients confirmed a corresponding loss of protein expression in each tumor, whereas normal testisin expression was detected in the adjacent unaffected testis tissue. Representative examples are shown in Fig. 5, *E-I*. Fig. 5*E* shows testisin staining in

an unaffected seminiferous tubule of patient 795, showing predominant testisin staining in pachytene spermatocytes, similar to that observed in normal testis. No testisin staining was detected in the mixed germ cell tumor from this patient (Fig. 5*F*). Fig. 5*G* shows testisin staining, which is typical for normal testis, in an unaffected tubule of patient 798, with a corresponding loss of testisin expression in the seminoma from this patient (Fig. 5*H*). It was generally observed that testisin expression was normal in morphologically normal tissue adjacent to the tumor, as illustrated in the tumor/unaffected tissue junction from patient 798 (Fig. 5*I*). These data suggest that loss of testisin expression is associated with testicular germ cell tumor formation and/or progression.

**Localization of the Testisin Gene by FISH.** The chromosomal localization of the human testisin gene was mapped by FISH to human metaphase chromosomes from two normal males. Analysis of 20 metaphase chromosomes from one normal male showed strong signal on one or both chromatids of chromosome 16 in the region 16p13.2-16pter; 87% of this signal was at 16p13.3 (Fig. 7). There was a total of 8 nonspecific background dots observed in these 20 metaphases. A similar result was obtained from hybridization of the probe to 15 metaphases from the second normal male (data not shown).



Fig. 6. Testisin mRNA is lost in testicular tumors. Northern blot analysis of paired unaffected testis (Lanes M) and primary testicular tumors (Lanes T) analyzed using radiolabeled full-length probe encoding testisin cDNA. Testicular cancer specimens 438, 616, 788, and 798 were seminomas; 783 was a mixed germ cell tumor; 1007 was a yolk sac tumor; and 619 and 795 were teratomas. Lane P, a section of normal testis obtained following bilateral orchiectomy for treatment of prostate cancer. As a control for the amount of RNA loaded in each lane, each blot was reprobed using a radiolabeled oligonucleotide directed against 18S rRNA.



## DISCUSSION

Testicular tumors are rare, comprising 2% of all cancers in men; however, testicular cancer is the most common malignancy affecting males aged 20–35 years (31). Because the molecular basis of these cancers is not known, identification of cellular genes involved in testicular tumorigenesis will increase our understanding of development of testicular tumors and may provide the basis for new targeted therapies. In this study, we have characterized a novel cDNA, testisin, which encodes a serine proteinase that is strongly and specifically expressed by maturing primary spermatocytes prior to the first meiotic division. In addition to the loss of expression of testisin in germ cell tumors, localization of the testisin gene at chromosome band 16p13.3 suggests a potential role in suppression of tumorigenesis of testicular germ cell tumors.

Although the sequence of testisin is unique, homology comparisons showed testisin was a member of the chymotrypsin (S1) family of serine proteinases. These serine proteinases include a signature catalytic triad of His, Asp, and Ser amino acids and are generally produced as inactive zymogens that are activated following proteolytic cleavage. Testisin contains a characteristic serine proteinase activation motif (RIVGG) with cleavage predicted to occur following Arg<sup>41</sup>. This would release a proregion linked by a disulfide bond to the catalytic domain, which is typical of many of the members of this family. On the basis of the presence of an acidic amino acid, Asp, in the putative substrate binding pocket, active testisin would be predicted to cleave its target substrate with specificity for the basic amino acids, Arg or Lys (12).

Two isoforms of testisin, differing by two amino acids located near the catalytic histidine, result from a six-nucleotide insertion. The

existence of these isoforms may be evidence of intron-exon junctional sliding (32). The additional two amino acids occur in a loop that, in other serine proteinases, stabilizes primary interactions between surrounding structures of the proteinase and the substrate (12). Although this insertion is unlikely to influence the primary specificity of testisin for basic amino acids, it is possible that secondary effects, such as substrate affinity, may be different between the two isoforms.

Testisin includes hydrophobic regions at the NH<sub>2</sub> and COOH termini that are predicted to act as secretory and membrane attachment signals, respectively. Testisin is only the second human serine proteinase described with a hydrophobic COOH-terminal extension. The catalytic region of the vast majority of serine proteinases forms the COOH terminus, and most serine proteinases are either secreted or targeted to cytoplasmic storage organelles by an NH<sub>2</sub>-terminal signal sequence. Recently, however, some membrane-anchored serine proteinases have been identified in different species, including, in addition to testisin, human prostasin (20), mouse TESP-1, and mouse TESP-2 (6), each of which possess COOH-terminal amino acid extensions. The COOH-terminal extension of prostasin is believed to anchor prostasin to the plasma membrane of prostate epithelial cells, from which it may be proteolytically released into the semen (21). TESP-1 and TESP-2 are thought to be anchored to the cell membrane via a glycosyl-phosphatidylinositol linkage (7). Like these proteinases, testisin appears to be present on the plasma membrane, possibly attached via a glycosyl-phosphatidylinositol anchor.

The restricted expression pattern of testisin is consistent with a specialized role during male germ cell development. In the testes, testisin is expressed exclusively by primary spermatocytes, with intense staining in germ cells prior to the first meiotic division. This is the first described serine proteinase strongly expressed at such an early stage in germ cell development. Other described germ cell serine proteinases, acrosin (27), TESP1, and TESP2 (7), are synthesized at a much later stage and are present in mature sperm. Thus, testisin may represent a component of an as yet unrecognized proteolytic cascade involved in germ cell maturation, analogous to the fibrinolytic and coagulation cascades.

The physiological function of testisin is not yet known. Proteolysis is important for proliferation, apoptosis, differentiation, and cell migration; all processes that are integral to normal germ cell development. In testis, diploid spermatogonia differentiate into haploid spermatozoa following successive rounds of mitotic and meiotic cell divisions and extensive morphological restructuring. Biochemical events occurring during meiosis are poorly defined, although it is known that processes such as chromatin condensation, formation of synaptonemal complexes, and genetic recombination are proceeding (33). We hypothesize that loss of testisin expression may alter differentiation of immature germ cells and/or lead to arrest of testicular germ cell maturation and unregulated proliferation. Testisin could participate in proteolytic events required for migration of maturing germ cells in the adluminal space of the seminiferous tubule or in matrix remodeling. Alternatively, because exchange of soluble factors

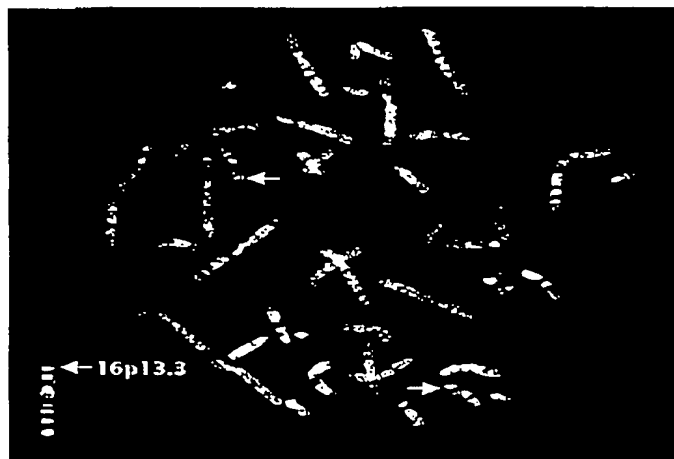


Fig. 7. Normal male metaphase chromosomes showing FISH with the testisin probe. FISH signals and the 4',6'-diamidino-2-phenylindole banding pattern were merged for figure preparation. Hybridization sites on chromosome 16 are indicated by arrows. The ideogram (bottom left) indicates that testisin maps to 16p13.3 (arrow).



and coordinated cell surface interactions between developing germ cells and Sertoli cells are essential for spermatogenesis (34), testisin may participate in proteolytic cleavage and release of specific factors and/or activation of bioactive molecules. Such events may be essential for normal meiotic cell division in spermatogenesis and, clearly, have implications for abnormalities in germ cell maturation, such as those that occur in sterility, fertility, and testicular cancer.

The testisin gene has been localized near the telomere of human chromosome 16, at 16p13.3. This region of human chromosome 16 is associated with high genetic instability: documented rearrangements underlie a variety of common human genetic disorders, including  $\alpha$ -thalassaemia, polycystic kidney disease, tuberous sclerosis, familial Mediterranean fever, and Rubenstein-Taybi syndrome (35). Loss of heterozygosity studies have identified 16p13.3 as a potential locus for a tumor suppressor gene associated with male germ cell tumors (2). It remains to be determined whether testisin functions as a tumor suppressor gene. However, the demonstrated loss of testisin mRNA and protein expression in testicular germ cell tumors implies its absence may contribute directly or indirectly to testicular tumor development or progression. Such a role parallels that proposed for the recently identified serine proteinase, normal epithelial cell specific-1 (NES1). NES1 is expressed in normal mammary epithelial cells and is down-regulated in most breast cancer cell lines (36). Expression of NES1 has recently been shown to inhibit anchorage-independent growth and suppress oncogenicity in nude mice (37), indicating a tumor suppressor role for this serine proteinase.

Taken together, our data support a role for testisin in testicular germ cell maturation and, possibly, in the initiation and/or progression of testicular cancers. The restricted expression of testisin and the similarities between testisin and other known serine proteinases suggest that testisin may have a unique and critical biological function in germ cell growth and/or differentiation in the testis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Ogbourne, M. Walsh, and M. McGuckin for technical assistance and helpful discussions.

## REFERENCES

- Trainer, T. D. Testis and excretory duct system. In: S. S. Sternberg (ed.), *Histology for Pathologists*, pp. 731-750. New York: Raven Press, 1992.
- Nicol, D., Teh, B. T., Strachan, N., Ward, G., and Martin, N. Familial testicular carcinoma: in search of genetic triggers. *Aust. N. Z. J. Surg.*, **64**: 418-420, 1994.
- Rajai, M. A., Al-Jehani, Povey, S., Delhanty, D. A., and Parrington, J. M. Loss of heterozygosity on chromosome arms 5q, 11p, 11q, 13q, and 16p in human testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **13**: 249-254, 1995.
- de Kreijter, D. M. Local regulation of testicular function. *Int. Rev. Cytol.*, **109**: 89-112, 1987.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.*, **244**: 19-61, 1994.
- Yamagata, K., Murayama, K., Okabe, M., Toshimori, K., Nakanishi, T., Kashiwabara, S., and Baba, T. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J. Biol. Chem.*, **273**: 10470-10474, 1998.
- Kohno, N., Yamagata, K., Yamada, S., Kashiwabara, S., Sakai, Y., and Baba, T. Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**: 658-665, 1998.
- Lilja, H. Significance of different molecular forms of serum PSA. The free, noncomplexed form of PSA versus that complexed to  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. *Urol. Clin. North Am.*, **20**: 681-686, 1993.
- Penitilla, T. L., Kaipia, A., Toppari, J., Parvinen, M., and Mali, P. Localization of urokinase- and tissue-type plasminogen activator mRNAs in rat testes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **105**: 55-64, 1994.
- Jones, R., Ma, A., Hou, S. T., Shalgi, R., and Hall, L. Testicular biosynthesis and epididymal endoproteolytic processing of rat sperm surface antigen 2B1. *J. Cell Sci.*, **109**: 2561-2570, 1996.
- Phelps, B. M., Koppel, D. E., Primakoff, P., and Myles, D. G. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J. Cell Biol.*, **111**: 1839-1847, 1990.
- Perona, J. J., and Craik, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Prot. Sci.*, **4**: 337-360, 1995.
- Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Zakari, A. E., Craik, C. S., and McKerrow, J. H. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 4863-4867, 1989.
- Elvin, C. M., Whan, V., and Riddles, P. W. A family of serine protease genes expressed in adult buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Mol. Gen. Genet.*, **240**: 132-139, 1993.
- Elvin, C. M., Vuocolo, T., Smith, W. J., Eisemann, C. H., and Riddles, P. W. An estimate of the number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). *Insect Mol. Biol.*, **3**: 105-115, 1994.
- Antalis, T. M., and Dickinson, J. L. Control of plasminogen activator inhibitor type 2 gene expression in the differentiation of monocytic cells. *Eur. J. Biochem.*, **205**: 203-209, 1992.
- Callen, D. F., Baker, E., Eyre, H. J., Chemos, J. E., Bell, J. A., and Sutherland, G. R. Reassessment of two apparent deletions of chromosome 16p to an ins(11;16) and a t(1;16) by chromosome painting. *Ann. Genet.*, **33**: 219-221, 1990.
- Kozak, M. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.*, **108**: 229-241, 1989.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132, 1982.
- von Heijne, G. Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.*, **184**: 99-105, 1985.
- Yu, J. X., Chao, L., and Chao, J. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostatic mRNA. *J. Biol. Chem.*, **270**: 13483-13489, 1995.
- Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature (Lond.)*, **389**: 607-610, 1997.
- Yu, J. X., Chao, L., Ward, D. C., and Chao, J. Structure and chromosomal localization of the human prostatic (PRSS8) gene. *Genomics*, **32**: 334-340, 1996.
- Hunt, J. E., Friend, D. S., Gurish, M. F., Feyfant, E., Sali, A., Huang, C., Ghildyal, N., Stechschulte, S., Austen, K. F., and Stevens, R. L. Mouse mast cell protease 9, a novel member of the chromosome 14 family of serine proteases that is selectively expressed in uterine mast cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 29158-29166, 1997.
- Beaubien, G., Rosinski-Chupin, I., Mattei, M. G., Mbikay, M., Chretien, M., and Seidah, N. G. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry*, **30**: 1628-1635, 1991.
- Leytus, S. P., Loeb, K. R., Hagen, F. S., Kurachi, K., and Davie, E. W. A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. *Biochemistry*, **27**: 1067-1074, 1988.
- Baba, T., Kashiwabara, S., Watanabe, K., Itoh, H., Michikawa, Y., Kimura, K., Takada, M., Fukamizu, A., and Arai, Y. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.*, **264**: 11920-11927, 1989.
- Tomita, N., Izumoto, Y., Horii, A., Doi, S., Yokouchi, H., Ogawa, M., Mori, T., and Matsubara, K. Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic prechymotrypsinogen cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**: 569-575, 1989.
- Chaganti, R. S. K., Rodriguez, E., and Mathew, S. Origin of adult male mediastinal germ-cell tumors. *Lancet*, **343**: 1130-1132, 1994.
- Skakkeback, N. E., Berthelsen, J. G., Giwercman, A., and Muller, J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursors of all types of germ cell tumors except spermatocytoma. *Int. J. Androl.*, **10**: 19-28.
- Senturia, Y. D. The epidemiology of testicular cancer. *Br. J. Urol.*, **60**: 285-291, 1987.
- Craik, C. S., Rutter, W. J., and Fletcher, R. Splice junctions: association with variation in protein structure. *Science (Washington DC)*, **220**: 1125-1129, 1983.
- Moens, P. B. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *Bioessays*, **16**: 101-106, 1994.
- Kierszenbaum, A. L. Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr. Rev.*, **15**: 116-134, 1994.
- Flint, J., Thomas, K., Micklem, G., Raynham, H., Clark, K., Doggett, N. A., King, A., and Higgs, D. R. The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat. Genet.*, **15**: 252-257, 1997.
- Liu, X.-L., Wazer, D. E., Watanabe, K., and Band, V. Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. *Cancer Res.*, **56**: 3371-3379, 1996.
- Goyal, J., Smith, K. M., Cowan, J. M., Wazer, D. E., Lee, S. W., and Band, V. The role for NES1 serine proteinase as a novel tumor suppressor. *Cancer Res.*, **58**: 4782-4786, 1998.





PCT

E P

U S

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 C2-006PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06111	国際出願日 (日.月.年) 02.11.99	優先日 (日.月.年) 04.11.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社 中外分子医学研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40,  
C12P 21/08, C12Q 1/37 // (C12P21/02, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 9/00~99, C12N 15/00~90, C12N 1/00~5/28, C12P 21/00~08, G01N 33/53~579,  
C07K16/00~46, C12Q1/00~70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P Y	WO, 99/26647, A1 (NOVO NORDISK A/S), 3.6月.1999 (03.06.99) & AU, 9913336, A	3 5-7
P A	Cancer Research, Vol. 59, No. 13, p. 3199-3205, (July 1 1999), John D. Hooper et al., "Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors"	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 01. 00

国際調査報告の発送日

22.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.24, (1997), p.15434-15441, Jiuyu Sun et al., "A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)".	1 2
A	JP, 8-205893, A (住友金属工業株式会社), 13. 8 月. 1997 (13. 08. 97) ファミリーなし	1 1, 1 2
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.245, No.3 , p.658-665 , (1998), Nobuhisa Kohno et al., "Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome".	1 - 1 5



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

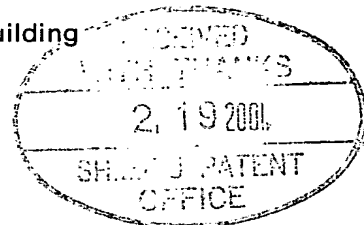
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 23 January 2001 (23.01.01)	
Applicant's or agent's file reference C2-006PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/06111	International filing date (day/month/year) 02 November 1999 (02.11.99)
Applicant CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. et al	

## 1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

## 2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

## 3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Eliott Peretti
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38





## P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 C2-006PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06111	国際出願日 (日.月.年) 02.11.99	優先日 (日.月.年) 04.11.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40, C12P 21/08, C12Q 1/37 //(C12P21/02, C12R1:91)		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社中外分子医学研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.11.99	国際予備審査報告を作成した日 25.07.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 育 藤 真 由 美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 8931



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-11, 13-15	有
	請求の範囲	12	無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-11, 13-15	有
	請求の範囲	12	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-15	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## &lt;請求項12について&gt;

## &lt;引用文献&gt;

1. The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.24, (1997), p.15434-15441, Jiuyu Sun et al.,  
"A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)".

請求項12に係る発明、すなわち、請求項1又は2記載のタンパク質(トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ)の活性を阻害する化合物には、セリンプロテアーゼ阻害活性を有する物質であれば包含される可能性がある。

ところで、引用文献1にはセリンプロテアーゼ阻害物質が記載されており、該物質も請求項12に係る本願発明に含まれる蓋然性がある。したがって、引用文献1記載のセリンプロテアーゼ阻害物質は本願請求項12に係る本願発明と同一であると認める。

## &lt;請求項1-11, 13-15について&gt;

請求項1-11, 13-15に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連すると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせるにより、当業者にとって容易に発明できたものでもない。



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
PCT/DK98/00510 [PX]	03. 06. 99	20. 1. 98	20. 11. 97 03. 12. 97

〈請求項 3, 5-7 について〉

本願請求項 3 に記載の「部分ペプチド」に関し、本願明細書中では明確な定義はなく、請求項 1 または 2 記載の蛋白質の「部分ペプチド」としてアミノ酸数がどれくらい、部分ペプチドの有する機能の特定等は何らなされていない。したがって、請求項 3 記載の「部分ペプチド」については、請求項 1 又は 2 記載の蛋白質の部分でありさえすればよく、極端な場合アミノ酸配列数個程度一致しているのみで、請求項 1 または 2 記載の蛋白質が有する機能を有しないものさえも含まれるものと認める。

ところで、上記先願明細書 (PCT/DK98/00510) には、本願明細書中の

- (1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列とは連続する 9 個のアミノ酸配列が一致、
- (2) 配列番号 4, 6, 10 に記載のアミノ酸配列とは連続する 14 個のアミノ酸配列が一致、
- (3) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列とは連続する 15 個のアミノ酸配列が一致、するアミノ酸配列を有する蛋白質・ペプチドが記載されている。

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

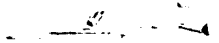




補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)


## 第 VI 欄の続き

この先願明細書に記載されている上記蛋白質・ペプチドの有する機能は、本願請求項1又は2記載の蛋白質の有する機能とは異なる。しかしながら、上述したように、本願請求項3には部分ペプチドの機能的特定さえも何らなされていないことから、先願明細書に記載の上記蛋白質・ペプチドは、本願請求項3記載の発明と同一と認める。



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人代理人  清水 初志  あて名  〒 300-0847  茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所	殿  
--	--

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)  
[PCT規則44.1]

発送日  
(日.月.年)

22.02.00

出願人又は代理人 の書類記号  C2-006PCT	今後の手続きについては、下記1及び4を参照。
国際出願番号  PCT/J P99/06111	国際出願日 (日.月.年)  02.11.99
出願人 (氏名又は名称)  株式会社 中外分子医学研究所	

- ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。  
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出  
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。  
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。  
詳細については添付用紙の備考を参照すること。  
どこへ 直接次の場所へ  
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22)740.14.35  
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
- ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
- ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。  
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。  
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
- 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。  
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。  
出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。  
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官  電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 8931
--	---	----------



P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 C 2 - 0 0 6 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 ) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 6 1 1 1	国際出願日 (日.月.年) 0 2 . 1 1 . 9 9	優先日 (日.月.年) 0 4 . 1 1 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 株式会社 中外分子医学研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40,  
C12P 21/08, C12Q 1/37 // (C12P21/02, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 9/00~99, C12N 15/00~90, C12N 1/00~5/28, C12P 21/00~08, G01N 33/53~579,  
C07K16/00~46, C12Q1/00~70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P Y	WO, 99/26647, A1 (NOVO NORDISK A/S), 3.6月.1999 (03.06.99) & AU, 9913336, A	$\frac{3}{5-7}$
P A	Cancer Research, Vol. 59, No. 13, p. 3199-3205, (July 1 1999), John D. Hooper et al., "Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors"	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.01.00

国際調査報告の発送日

22.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.24, (1997), p.15434-15441, Jiuyu Sun et al., "A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)".	1 2
A	JP, 8-205893, A (住友金属工業株式会社), 13. 8 月. 1997 (13. 08. 97) ファミリーなし	1 1, 1 2
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 245, No. 3 , p. 658-665 , (1998), Nobuhisa Kohno et al., "Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome".	1 - 1 5



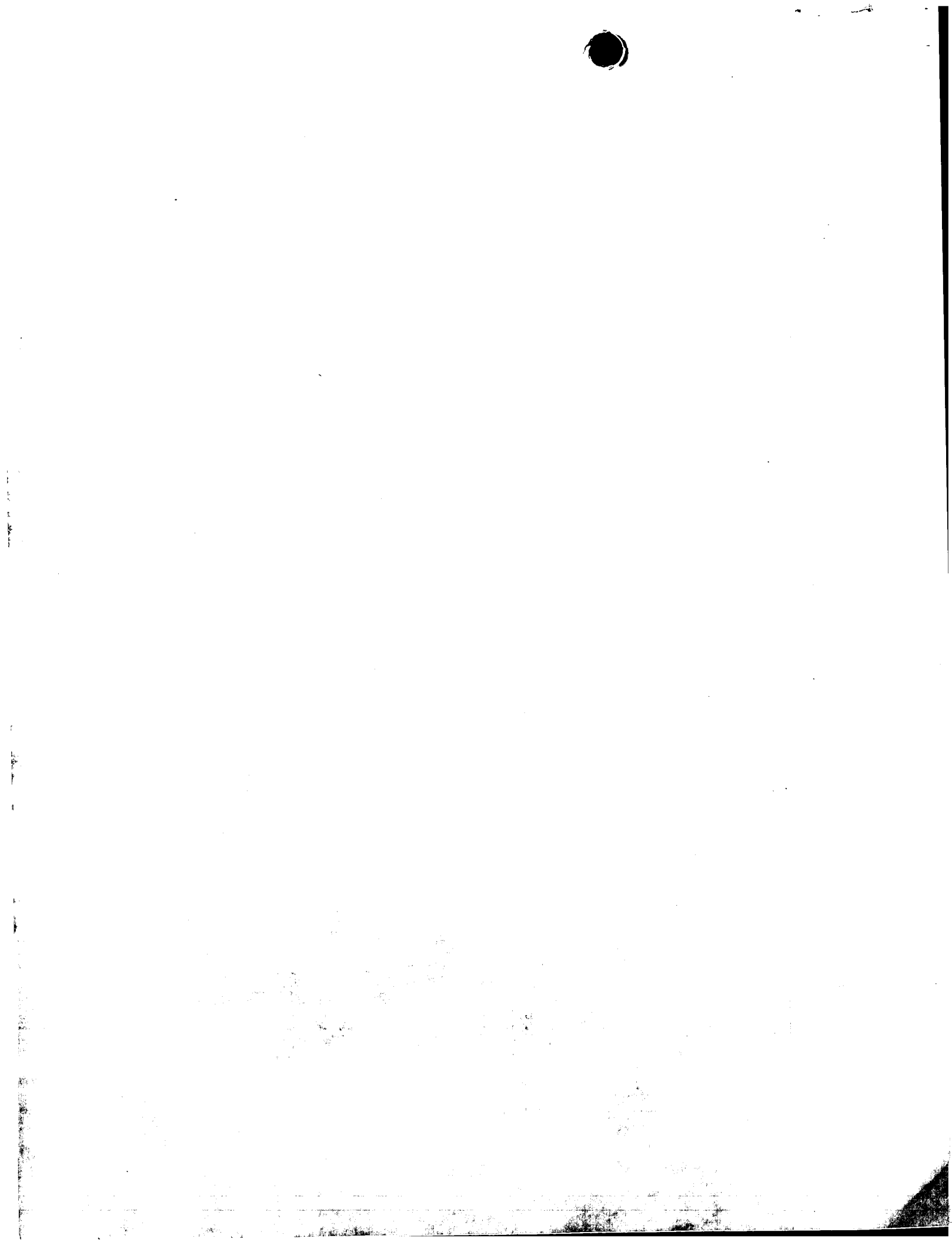


## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年11月02日 (02.11.1999) 火曜日 12時11分24秒

C2-006PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/RO/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)
0-5	申立て: 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	C2-006PCT
I	発明の名称	新規トリブシンファミリーセリンプロテアーゼ
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	
II-4ja	名称	株式会社 中外分子医学研究所
II-4en	Name	CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.
II-5ja	あて名:	300-4101 日本国 茨城県 新治郡新治村 永井153番地2
II-5en	Address:	153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-4101 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	妹尾 千明
III-1-4en	Name (LAST, First)	SEN00, Chiaki
III-1-5ja	あて名:	300-4101 日本国 茨城県 新治郡新治村 永井153番地2
III-1-5en	Address:	株式会社 中外分子医学研究所内 c/o CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. 153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-4101 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年11月02日 (02.11.1999) 火曜日 12時11分24秒

III-2 III-2-1 III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja   III-2-5en   III-2-6 III-2-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  沼田 真理子 NUMATA, Mariko 300-4101 日本国 茨城県 新治郡新治村 永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 c/o CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. 153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-4101 Japan 日本国 JP 日本国 JP
IV-1  IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja  IV-1-2en  IV-1-3 IV-1-4	代理人又は共通の代表者、通知 のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動 する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  電話番号 ファクシミリ番号	代理人 (agent)  清水 初志 SHIMIZU, Hatsushi 300-0847 日本国 茨城県 土浦市 卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan 0298-41-2001 0298-41-2009
IV-2  IV-2-1ja IV-2-1en	その他の代理人  氏名 Name(s)	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 橋本 一憲 HASHIMOTO, Kazunori
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である 他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国 である他の国



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

C2-006PCT

原本(出願用) - 印刷日時 1999年11月02日 (02.11.1999) 火曜日 12時11分24秒

V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW	
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締 約国になった国)	MA	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日から 15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主 張		
VI-1-1	先の出願日	1998年11月04日 (04.11.1998)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平10-313366	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書 (配列表を除く)	47	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	c2-006pct要約書.txt
VIII-5	図面	17	-
VIII-6	明細書の配列表	49	-
VIII-7	合計	120	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体による多 媒体及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディス ク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの 記録形式等の情報を記載 した書面	-
VIII-17	その他	納付する手数料に相当す る特許印紙を貼付した書 面	-





## 特許協力条約に基づく国際出願願書

C2-006PCT

原本(出願用) - 印刷日時 1999年11月02日 (02.11.1999) 火曜日 12時11分24秒

VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)
IX-1	提出者の記名押印	
IX-1-1	氏名(姓名)	清水 初志
IX-2	提出者の記名押印	
IX-2-1	氏名(姓名)	橋本 一憲

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1  
関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



殿

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]

発送日  
(日.月.年)

22.02.00

出願人又は代理人  
の書類記号

C2-006PCT

応答期間

上記発送日から 2 ヶ月以内

国際出願番号

PCT/J P99/06111

国際出願日

(日.月.年) 02.11.99

優先日

(日.月.年) 04.11.98

国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573,  
C07K 16/40, C12P 21/08, C12Q 1/37 //(C12P21/02, C12R1:91)

出願人 (氏名又は名称)

株式会社 中外分子医学研究所

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

- I ☒ 見解の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に应答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

应答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 04.03.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4 B

8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

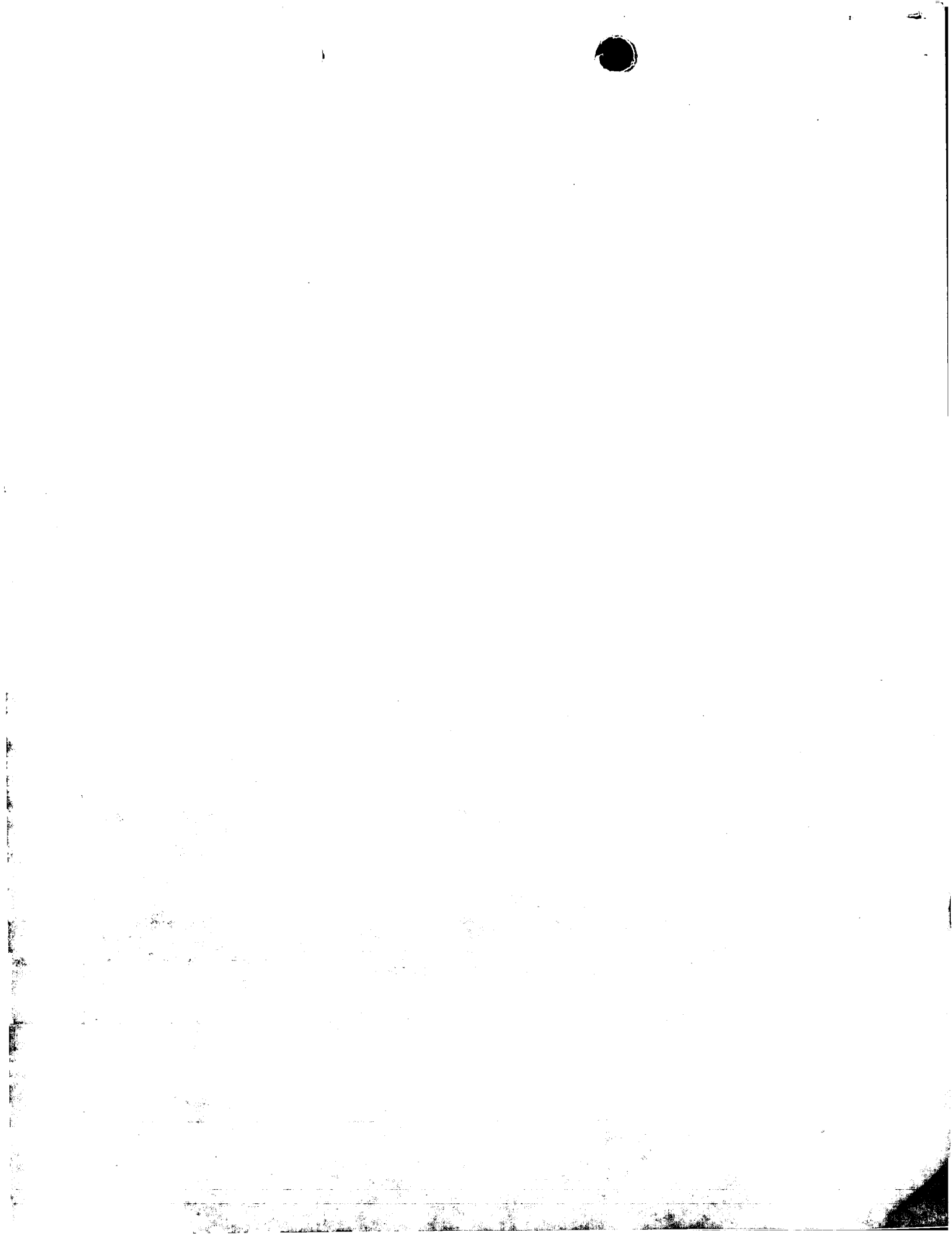
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-11, 13-15	有
	請求の範囲	12	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-11, 13-15	有
	請求の範囲	12	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-15	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

## &lt;引用文献1&gt;

1. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 24, (1997), p.15434-15441, Jiuyu Sun et al.,  
"A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)".

## &lt;請求項12について&gt;

請求項12に係る発明、すなわち、請求項1又は2記載のタンパク質（トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ）の活性を阻害する化合物には、セリンプロテアーゼ阻害活性を有する物質であれば包含される可能性がある。

ところで、引用文献1にはセリンプロテアーゼ阻害物質が記載されており、該物質も請求項12に係る本願発明に含まれる蓋然性がある。したがって、引用文献1記載のセリンプロテアーゼ阻害物質は本願請求項12に係る本願発明と同一であると認める。





## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書(PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
PCT/DK98/00510 [P X]	03. 06. 99	20. 11. 98	20. 11. 97 03. 12. 97

## 〈請求項3、5-7について〉

本願請求項3に記載の「部分ペプチド」に関し、本願明細書中では明確な定義はなく、請求項1または2記載の蛋白質の「部分ペプチド」としてアミノ酸数がどれくらいか、部分ペプチドの有する機能の特定等は何らなされていない。したがって、請求項3記載の「部分ペプチド」については、請求項1又は2記載の蛋白質の部分でありさえすればよく、極端な場合アミノ酸配列数個程度一致しているのみで、請求項1または2記載の蛋白質が有する機能を有しないものさえも含まれるものと認める。

ところで、引用文献1 (以下先願明細書という) には、本願明細書中の

- (1) 配列番号2に記載のアミノ酸配列とは連続する9個のアミノ酸配列が一致、
- (2) 配列番号4, 6, 10に記載のアミノ酸配列とは連続する14個のアミノ酸配列が一致、
- (3) 配列番号8に記載のアミノ酸配列とは連続する15個のアミノ酸配列が一致、するアミノ酸配列を有する蛋白質・ペプチドが記載されている。

## 2. 書面による開示以外の開示(PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--



補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第 VI 欄の 1. の続き

この先願明細書に記載されている上記蛋白質・ペプチドの有する機能は、本願請求項 1 又は 2 記載の蛋白質の有する機能とは異なる。しかしながら、上述したように、本願請求項 3 には部分ペプチドの機能的特定さえも何らなされていないことから、先願明細書に記載の上記蛋白質・ペプチドは、本願請求項 3 記載の発明と同一と認める。



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building,  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 14 January 2000 (14.01.00)	
Applicant's or agent's file reference C2-006PCT	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/06111	International filing date (day/month/year) 02 November 1999 (02.11.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 04 November 1998 (04.11.98)
Applicant CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
04 Nove 1998 (04.11.98)	10-313366	JP	06 Janu 2000 (06.01.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Taïeb Akremi
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



殿

P C T

## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）  
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/06111

RO105

発送日（日、月、年）

09.11.99

出願人又は代理人  
の書類記号

C2-006PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06111

国際出願日（日、月、年）

02.11.99

優先日（日、月、年）

04.11.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社 中外分子医学研究所

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、09日11月99年に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官





## PCT COOPERATION TREA

PCT

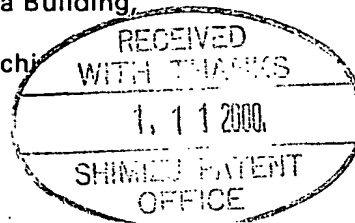
NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building,  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 16 November 1999 (16.11.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference C2-006PCT	International application No. PCT/JP99/06111

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. (for all designated  
States except US)  
SENOO, Chiaki et al (for US)

International filing date : 02 November 1999 (02.11.99)  
Priority date(s) claimed : 04 November 1998 (04.11.98)  
Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 12 November 1999 (12.11.99)  
List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM  
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG  
National : AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW


## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  Masashi HONDA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



## INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

**For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.**

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

## REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

P C T

## 調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）  
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP99/06111

SA202

発送日（日．月．年）

09.11.99

出願人又は代理人  
の書類記号

C2-006PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06111

国際出願日（日．月．年）

02.11.99

優先日（日．月．年）

04.11.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社 中外分子医学研究所

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

09 日 11 月 99 年（受理の日）

2. ☒ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。
3. 国際調査報告の作成期間  
国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。
4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



P C T

## 国際予備審査請求書の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、実施細則601(a)〕

PCT/JP99/06111

PE402

発送日（日・月・年）

09.11.99

出願人又は代理人

の書類記号

C2-006PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/06111

国際出願日（日・月・年）

02.11.99

優先日（日・月・年）

04.11.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社 中外分子医学研究所

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

02日11月99年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日  
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日  
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）  
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官





特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

清水 初志

殿

P C T

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市御町1-1-1

関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）

〔PCT規則71.1〕

発送日

（日.月.年）

05.09.00

出願人又は代理人  
の書類記号

C2-006PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P99/06111

国際出願日

（日.月.年） 02.11.99

優先日

（日.月.年） 04.11.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社中外分子医学研究所

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



特許協力条約に基づく国際出願  
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求  
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄		請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の登録記号 C2-006PCT	
国際出願番号	国際出願日 (日. 月. 年)	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 04. 11. 98	
発明の名称 新規トリブシンファミリーセリンプロテアーゼ			
第 II 欄 出願人			
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		電話番号:	
株式会社 中外分子医学研究所 CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. 〒300-4101 日本国茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun IBARAKI 300-4101 JAPAN		ファクシミリ番号:	
		加入電話番号:	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
妹尾 千明 SEN00 Chiaki 〒300-4101 日本国茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社 中外分子医学研究所内 c/o CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. 153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, IBARAKI 300-4101 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
沼田 真理子 NUMATA Mariko 〒300-4101 日本国茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社 中外分子医学研究所内 c/o CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. 153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, IBARAKI 300-4101 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input type="checkbox"/> その他の出願人が続集に記載されている。			



## 第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

電話番号：

0298-41-2001

ファクシミリ番号：

0298-41-2009

加入電話番号：

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi  
 10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori  
 〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
 Kantetsu Tsukuba Bldg.6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi,  
 IBARAKI 300-0847 JAPAN

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

## 第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：\*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。☐ 明細書に関して☐ 出願時のものを基礎とすること。☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。☐ 請求の範囲に関して☐ 出願時のものを基礎とすること。☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。☐ 図面に関して☐ 出願時のものを基礎とすること。☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後で延期されることを希望する（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)））。  
（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。）

\* 記入がない場合は、1) 補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、☒ 国際出願の提出時の言語である。☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。☐ 国際出願の公開の言語である。☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

## 第V欄 国の選択

出願人は、選任資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。： .....



## 第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

## 国際予備審査機関記入欄

受 領

未 受 領

1. 国際出願の翻訳文・・・・・・・・・・・・・・・・・・

枚

☐☐

2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書・・・・・・・・

枚

☐☐3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書  
(又は、要求された適合性補正)の写し・・・・・・・・

枚

☐☐4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書  
(又は、要求された適合性補正)の写し・・・・・・・・

枚

☐☐

5. 書簡・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

枚

☐☐

6. その他 (書類名を具体的に記載する) :

枚

☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙3. ☐ 包括委任状の写し☒ 添付した書類に相当する特許印紙を4. ☐ 記名押印 (署名) に関する説明書☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面5. ☐ スクレオチド又はアミノ酸配列表  
(フレキシブルディスク)2. ☐ 別個の記名押印された委任状6. ☐ その他 (書類名を具体的に記載する) :

## 第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



## 国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

## 国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:





PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 12 SEP 2000

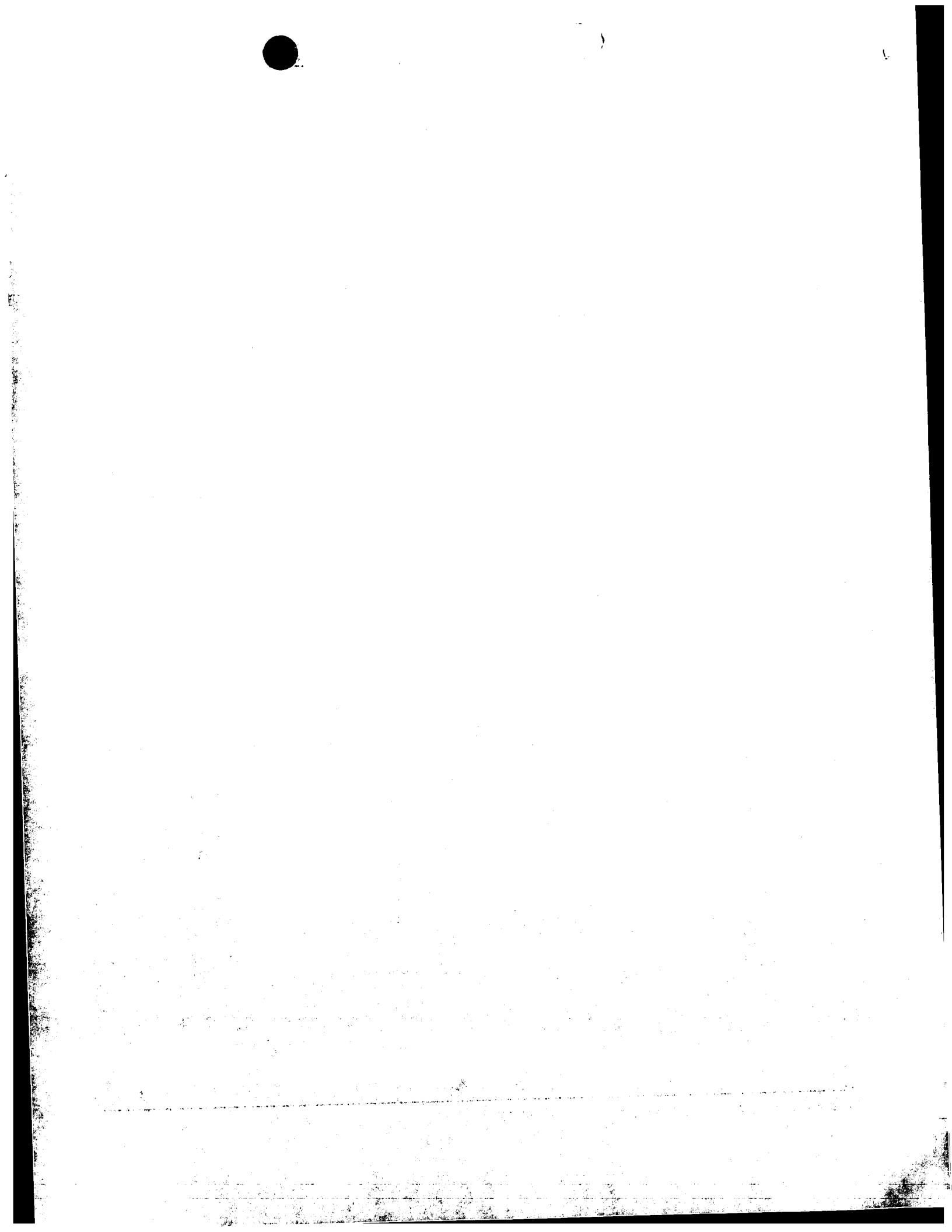
WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 C2-006PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06111	国際出願日 (日.月.年) 02.11.99	優先日 (日.月.年) 04.11.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N 9/64, C12N 15/57, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40, C12P 21/08, C12Q 1/37 //(C12P21/02, C12R1:91)		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社中外分子医学研究所		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☒ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.11.99	国際予備審査報告を作成した日 25.07.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  育 藤 真 由 美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 8931



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |   |       |        |                      |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |   |       |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |   |       |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |   |       |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-11, 13-15	有
	請求の範囲	12	無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-11, 13-15	有
	請求の範囲	12	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-15	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

&lt;請求項12について&gt;

&lt;引用文献&gt;

1. The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.24, (1997), p.15434-15441, Jiuyu Sun et al.,  
"A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the gransyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)".

請求項12に係る発明、すなわち、請求項1又は2記載のタンパク質(トリプシンファミリーセリンプロテアーゼ)の活性を阻害する化合物には、セリンプロテアーゼ阻害活性を有する物質であれば包含される可能性がある。

ところで、引用文献1にはセリンプロテアーゼ阻害物質が記載されており、該物質も請求項12に係る本願発明に含まれる蓋然性がある。したがって、引用文献1記載のセリンプロテアーゼ阻害物質は本願請求項12に係る本願発明と同一であると認める。

&lt;請求項1-11, 13-15について&gt;

請求項1-11, 13-15に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連すると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより、当業者にとって容易に発明できたものでもない。



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
PCT/DK98/00510 [PX]	03. 06. 99	20. 1. 98	20. 11. 97 03. 12. 97

〈請求項 3, 5-7 について〉

本願請求項 3 に記載の「部分ペプチド」に関し、本願明細書中では明確な定義はなく、請求項 1 または 2 記載の蛋白質の「部分ペプチド」としてアミノ酸数がどれくらいか、部分ペプチドの有する機能の特定等は何らなされていない。したがって、請求項 3 記載の「部分ペプチド」については、請求項 1 又は 2 記載の蛋白質の部分でありさえすればよく、極端な場合アミノ酸配列数個程度一致しているのみで、請求項 1 または 2 記載の蛋白質が有する機能を有しないものさえも含まれるものと認める。

ところで、上記先願明細書 (PCT/DK98/00510) には、本願明細書中の

- (1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列とは連続する 9 個のアミノ酸配列が一致、
  - (2) 配列番号 4, 6, 10 に記載のアミノ酸配列とは連続する 14 個のアミノ酸配列が一致、
  - (3) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列とは連続する 15 個のアミノ酸配列が一致、
- するアミノ酸配列を有する蛋白質・ペプチドが記載されている。

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--





補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 VI 欄の続き

この先願明細書に記載されている上記蛋白質・ペプチドの有する機能は、本願請求項1又は2記載の蛋白質の有する機能とは異なる。しかしながら、上述したように、本願請求項3には部分ペプチドの機能的特定さえも何らなされていないことから、先願明細書に記載の上記蛋白質・ペプチドは、本願請求項3記載の発明と同一と認める。



47

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 WAZ9916	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/06136	国際出願日 (日.月.年) 04. 11. 99	優先日 (日.月.年) 04. 11. 98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C08L9/02, C08L27/06		
出願人 (氏名又は名称) 日本ゼオン株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>                    </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 26. 11. 99	国際予備審査報告を作成した日 29. 08. 00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  原田 隆興  電話番号 03-3581-1101 内線 3495	4 J 9167



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-10

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲 1-10

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-10

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## (1) 請求項1-10について

請求項1-10は、国際調査報告で引用された文献1-4により進歩性を有しない。

文献1又は4に記載の組成物の可塑剤として、文献2又は3に記載の可塑剤を使用すること、文献1に記載の組成物のニトリルゴム又は文献4に記載のゴム状共重合体として、文献3に記載のニトリルゴムを使用することは、当業者にとって容易である。

## 記

文献1: JP, 02-215851, A (三菱化成ビニル株式会社)  
28. 8月. 1990 (28. 08. 90)

特許請求の範囲、第3頁左上欄第1行~第8行、第3頁左上欄第14行~第18行、  
第3頁右下欄第8行~第15行  
ファミリーなし

文献2: JP, 63-256680, A (豊田合成株式会社)  
24. 10月. 1988 (24. 10. 88)

特許請求の範囲、第2頁右下欄第16行~第17行、第3頁左上欄第3行~第5行  
ファミリーなし

文献3: US, 5362787, A (The Goodyear Tire & Rubber Company)  
8. 11月. 1994 (08. 11. 94)

特許請求の範囲、第6欄第44行~第58行

& JP, 07-196849, A、特許請求の範囲、第5頁第8欄第10行~第24行

& AU, 9478823, A & CA, 2118652, A  
& EP, 669370, A1 & BR, 9404432, A

文献4: JP, 61-188440, A (日本合成ゴム株式会社)  
22. 8月. 1986 (22. 08. 86)

特許請求の範囲  
ファミリーなし





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 May 2000 (11.05.00)		
Applicant's or agent's file reference C2-006PCT		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/06111	International filing date (day/month/year) 02 November 1999 (02.11.99)	
Applicant CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KR, MA, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



## PCT COOPERATION TREA

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 May 2000 (11.05.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference C2-006PCT			
International application No. PCT/JP99/06111	International filing date (day/month/year) 02 November 1999 (02.11.99)	Priority date (day/month/year) 04 November 1998 (04.11.98)	
Applicant CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,JP,KR,MA,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,  
GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,  
PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
11 May 2000 (11.05.00) under No. WO 00/26352

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



127  
QW

**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

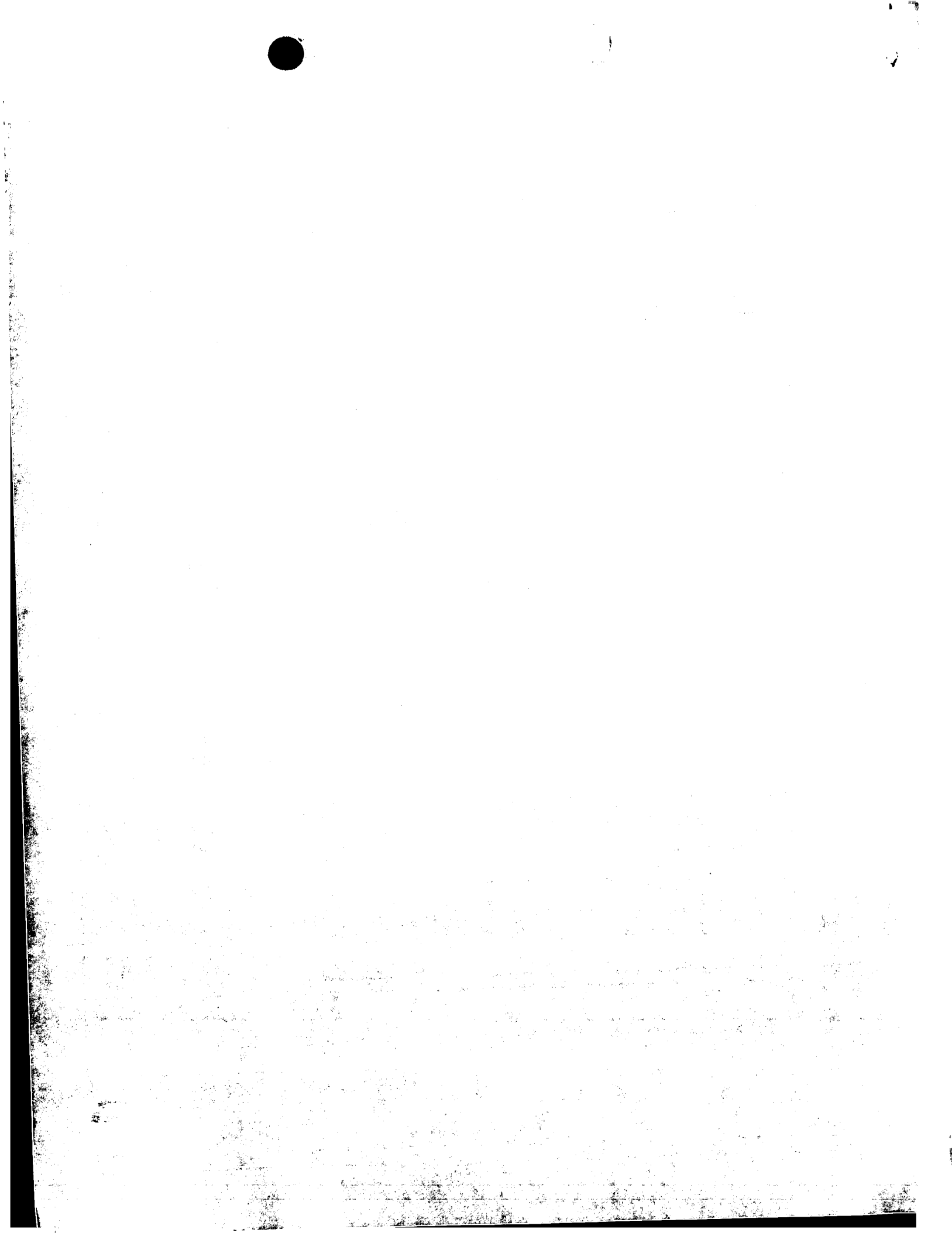
**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>C2-006PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP99/06111</b>	International filing date (day/month/year) <b>02 November 1999 (02.11.99)</b>	Priority date (day/month/year) <b>04 November 1998 (04.11.98)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N 9/64, 15/57, 5/10, C12P 21/02, G01N 33/573, C07K 16/40, C12P 21/08, C12Q 1/37 // (C12P 21/02, C12R 1:91)</b>		
Applicant <b>CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.</b>		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand <b>02 November 1999 (02.11.99)</b>	Date of completion of this report <b>25 July 2000 (25.07.2000)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06111

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP99/06111

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11,13-15	YES
	Claims	12	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11,13-15	YES
	Claims	12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Claim 12

Cited Document

1. Jiuyu Sun et al., "A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9)," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 24, 1997, pages 15434-15441

The invention described in claim 12, i.e., the compounds inhibiting activity of the proteins (trypsin family serine proteases) described in Claims 1 and 2, may also include substances having serine protease activity.

However, document 1 describes serine protease inhibitors, and these substances are probably included in the inventions of this application described in Claim 12. Therefore, this examination finds that the invention described in Claim 12 of this application is identical to the serine protease inhibitors described in document 1.

Claims 1-11 and 13-15

The inventions described in Claims 1-11 and 13-15 are not described in any of the documents cited in the international search report or other relevant documents, and these inventions cannot easily be arrived at by persons skilled in the art by combining the descriptions found in those documents.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP99/06111

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
-------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------	---

\*See supplemental  
sheet

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)
--------------------------------	--	---



## Supplemental sheet of Box VI

Continuation of Box VI

## Claims 3 and 5-7

The "partial peptide" described in Claim 3 of this application is not clearly defined in the Specification, and the number of amino acids constituting a "partial peptide" of the protein described in Claims 1 and 2, the function possessed by the partial peptide, and the like are not set forth. Therefore, this examination finds that the "partial peptide" as described in Claim 3 may be any portion of the protein described in Claims 1 and 2, and in an extreme case, this may even include peptides corresponding to only a few of the amino acids in the sequence, but not having the function of the protein described in Claims 1 and 2.

However, in its Specification the previous application listed above (PCT/DK98/00510) describes proteins/peptides having an amino acid sequence in which (1) a continuous 9 residue amino acid sequence corresponds to the amino acid sequence described in Sequence No. 2, (2) a continuous 14 residue amino acid sequence corresponds to the amino acid sequences described as Sequence Nos. 4, 6, and 10, and (3) a continuous 15 residue amino acid sequence corresponds to the amino acid sequence described as Sequence No. 8.

The functions of the aforementioned proteins and peptides described in the previous application differ from those of the proteins described in Claims 1 and 2 of this application. However, as stated above, because there is no functional description whatsoever of the partial protein of Claim 3 in this application, this examination finds that the invention described in Claim 3 of this application is identical to the proteins/peptides set forth in the previous application.

